(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119156396 A
(43)申请公布日 2024.12.17

(21)申请号 202380032768.4

(22)申请日 2023.02.07

(30)优先权数据
63/307,371 2022.02.07 US
17/870,158 2022.07.21 US
17/870,174 2022.07.21 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.10.08

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2023/012488 2023.02.07

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/150375 EN 2023.08.10

(71)申请人 迪科疗法有限公司
地址 美国

(72)发明人 B·彭特鲁特 B·L·海布纳

(74)专利代理机构 北京市铸成律师事务所 11313
专利代理师 陈艳娟 王艳波

(51)Int.Cl.
C07K 14/165(2006.01)
A61K 47/64(2006.01)

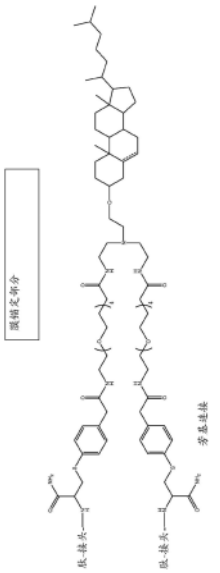
权利要求书3页 说明书27页 附图27页

(54)发明名称

用于治疗COVID感染的方法和组合物

(57)摘要

本发明提供一种具有下式的化合物:(肽-接头)n-B-疏水部分,其中每个肽独立地为HRC肽或靶向肽,前提是至少一个肽为HRC肽,每个接头独立地为二价连接部分,B为包括半胱氨酸、X和任选的Y和/或任选的Z的多价部分,其中X、Y和Z为本文所定义,且n为选自1、2、3或更多的整数,以及使用所述化合物在需要其的受试者中治疗或预防病毒感染的方法。



CN 119156396 A

1.一种具有下式的化合物:

(肽-接头)$_n$-B-疏水部分

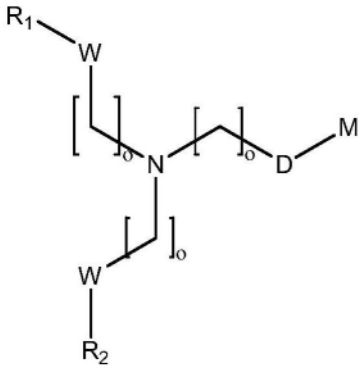
其中,每个肽独立地为HRC肽或靶向肽,前提是至少一个肽为HRC肽,每个接头独立地为二价连接部分,B为包括半胱氨酸、X和任选的Y和/或任选的Z的多价部分,其中X、Y和Z为本文所定义,且n为选自1、2、3或更多的整数。

2.权利要求1所述的化合物,其中,所述化合物包括靶向肽和一种或多种HRC肽。

3.权利要求1或2所述的化合物,其中,所述靶向肽为ACE2靶向肽或受体结合结构域肽。

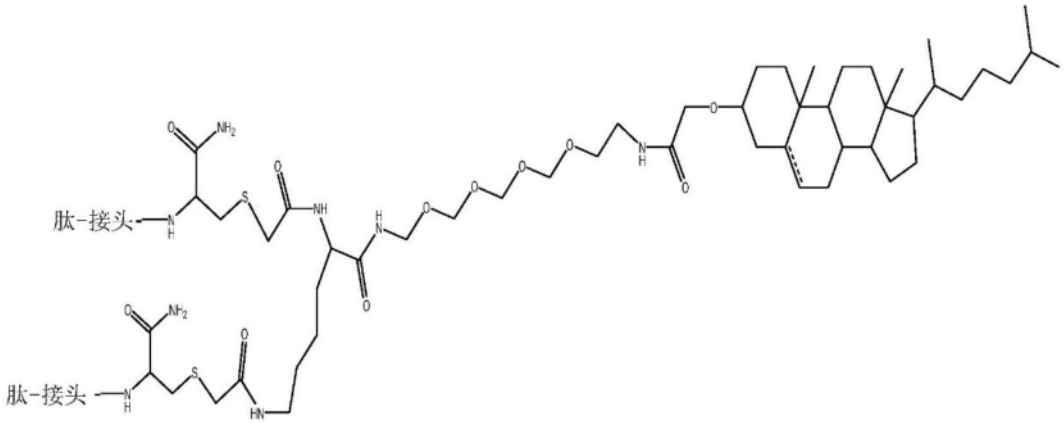
4.前述权利要求中任一项所述的化合物,其中,所述疏水部分为胆固醇。

5.前述权利要求中任一项所述的化合物,其中,所述Z不包含根据式(I)的结构:



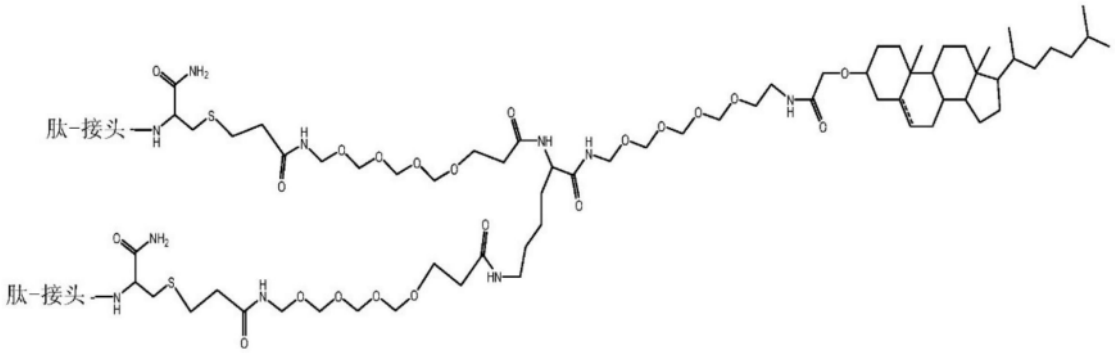
(I)。

6.权利要求1至4中任一项所述的化合物,其中,所述化合物具有以下结构:



其中,所述肽-接头为DISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQEL-GSGSG-。

7.权利要求1至4中任一项所述的化合物,其中,所述化合物具有以下结构:



其中,所述肽-接头为DISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQEL-GSGSG-。

8.一种药物组合物,其包括权利要求1至7中任一项所述的化合物和药学上可接受的载体。

9.一种治疗需要其的受试者中与SAR-Cov-2变体相关的呼吸道感染的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的具有下式的化合物:

(肽-接头)$_n$-B-疏水部分,

其中,每个肽独立地为HRC肽或靶向肽,前提是至少一个肽为HRC肽,每个接头独立地为二价连接部分,B为包含半胱氨酸和X以及可选的Y和/或可选的Z的多价部分,其中,X、Y和Z为本文所定义,且n为选自1、2、3或更多的整数;

其中,所述变体包括至少5个突变,其中,所述至少5个突变独立地在刺突蛋白SI亚基或S2亚基或其组合中。

10.权利要求9所述的方法,其中,所述化合物包括靶向肽和一种或多种HRC肽。

11.权利要求9或10所述的方法,其中,所述靶向肽为ACE2靶向肽或受体结合结构域肽。

12.权利要求9至11中任一项所述的方法,其中,所述疏水部分为胆固醇。

13.权利要求9至12中任一项所述的方法,其中,所述至少5个突变独立地在N末端结构域(NTD)、受体结合结构域(RBD)、融合肽(FP)结构域、七肽重复1(HR1)结构域或其组合中。

14.权利要求9至13中任一项所述的方法,其中,所述至少5个突变独立地选自图4中列出的突变。

15.权利要求14所述的方法,其中,所述至少5个突变独立地选自由以下组成的组:

(i)来自SAR-Cov-2α变体的至少5个突变;

(ii)来自SAR-Cov-2β变体的至少5个突变;

(iii)来自SAR-Cov-2δ变体的至少5个突变;和

(iv)来自SAR-Cov-2o变体的至少5个突变。

16.权利要求13至15中任一项所述的方法,其中,所述变体包括至少10个突变。

17.权利要求13至15中任一项所述的方法,其中,所述变体包括至少15个突变。

18.权利要求13至15中任一项所述的方法,其中,所述变体包括至少20个突变。

19.权利要求9所述的方法,其中,SARS-CoV-2包括选自B.1.1.7(α)、B.1.351(β)、P.1(γ)、B.1.617.2(δ)、B.1.429/B.1.427(ε)、B.1.617.1(κ)、B.1.525(η)、B.1.526(ι)、P.3(θ)、P.2(ζ)和B.1.1.529(o)的至少一个变体。

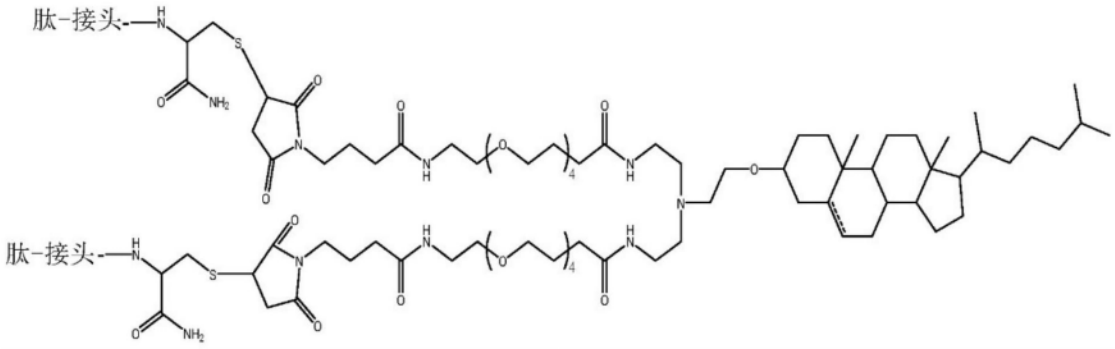
20.权利要求19所述的方法,其中,SARS-CoV-2包括选自A.1-A.6、B.3-B.7、B.9、B.10、B.13-B.16、B.2、B.1系、P.1、P.2、P.3和R.1的至少一个变体。

21.权利要求20所述的方法,其中,B.1系包括以下中的至少一个,包括但不限于,B.1、B.1.1、B.1.1.7、含有E484K的B.1.1.7、B.1.2、B.1.5-B.1.72、B.1.9、B.1.13、B.1.22、B.1.26、B.1.37、B.1.3-B.1.66、B.1.177、B.1.243、B.1.313、B.1.351、B.1.427、B.1.429、B.1.525、B.1.526、B.1.526.1、B.1.526.2、B.1.617、B.1.617.1、B.1.617.2、B.1.617.3、B.1.619、B.1.620和B.1.621。

22.权利要求9至21中任一项所述的方法,其中,所述施用使用鼻内喷雾器、吸入器或雾化器实现。

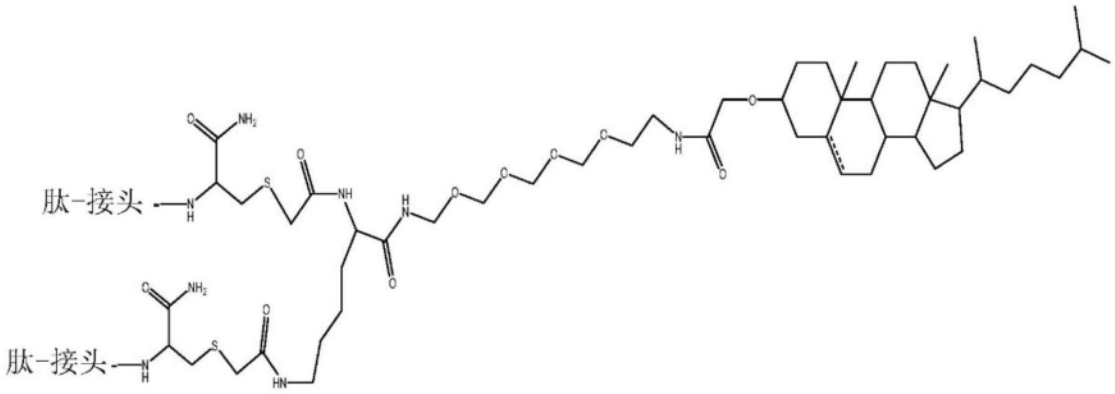
23.权利要求9至22中任一项所述的方法,其中,所述化合物与至少一种其他抗病毒活性剂或疗法联合施用。

24.权利要求9至23中任一项所述的方法,其中,所述化合物具有以下结构:



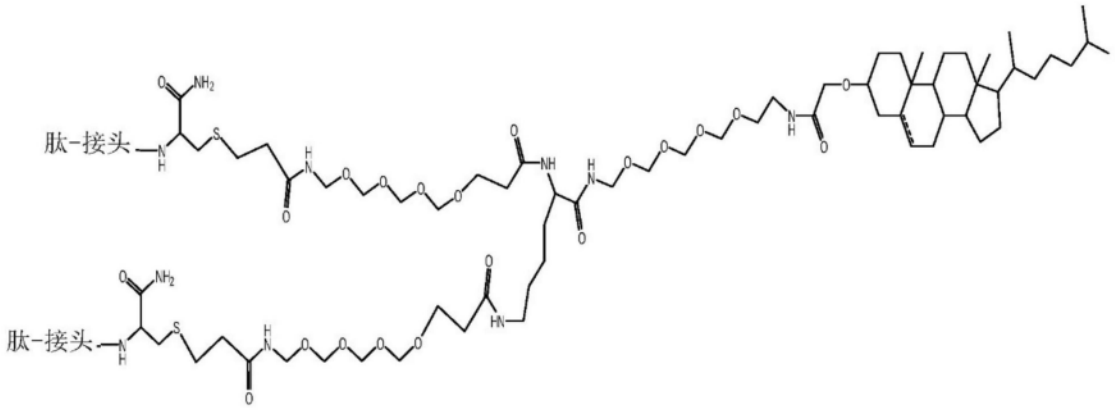
其中,所述肽-接头为DISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQEL-GSGSG-。

25.权利要求9至23中任一项所述的方法,其中,所述化合物具有以下结构:



其中,所述肽-接头为DISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQEL-GSGSG-。

26.权利要求9至23中任一项所述的方法,其中,所述化合物具有以下结构:



其中,所述肽-接头为DISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQEL-GSGSG-。

用于治疗COVID感染的方法和组合物

[0001] 相关申请

[0002] 本申请是2022年7月21日提交的美国申请号17/870,158和美国申请号17/870,174两者的部分继续申请。本申请还要求于2022年2月7日提交的美国临时申请号63/307,371的优先权。上述申请的全部教导通过引用并入本文。

背景技术

[0003] 已知多种病毒引起人类呼吸道感染,根据其临床表现,引起的疾病通常分类为如普通感冒、流感、细支气管炎、哮吼或肺炎。这类感染通常是自限性的,但在某些患者中,特别是老年人、婴儿以及免疫系统受损者,可导致更严重的疾病,包括可危及生命的肺炎。用于这些疾病的大多处方药品仅缓解症状,并且很少有改变任意这些疾病的进程的可用药物。此外,最近已出现由动物源性病毒引起的新型呼吸道疾病,包括2002年确认的严重急性呼吸综合征冠状病毒(SARS-CoV)、2012年确认的中东呼吸综合征冠状病毒(MERS-CoV),以及最近于2019年12月首次描述的并引起称为COVID-19疾病的严重急性呼吸综合征冠状病毒-2(SARS-CoV-2)。SARS-CoV-2病毒仍然存在全球威胁。SARS-CoV和MERS-CoV目前对人类群体不危险,但可在动物宿主(animal reservoir)中存在,未来有威胁人类的潜力。

[0004] 此外,冠状病毒正在快速突变,增加新形式病毒可逃避现有疗法的担忧且将需要迅速开发新疗法。

[0005] 在用于治疗或预防病毒性呼吸道感染的方法的领域中仍有需求。

发明内容

[0006] 本发明基于以下发现:通过利用点击化学将冠状病毒刺突蛋白和其他竞争性配体与脂质分子缀合,如胆固醇或生育酚等新的抗病毒缀合物可按需合成。方法提供用于按需合成强力抗病毒材料的可编程快速响应平台。平台包括四个模块:病毒融合肽抑制剂、膜锚定单元(如脂质分子)、ACE2靶向肽和刺突结合肽。具有至少一个模块的共价组合包括缀合至另一模块的引起有效的抗冠状病毒材料的融合肽抑制剂。模块可通过由至少一个硫或氮芳基连接组成的共价框架连接。其他模块由包括三唑、酰胺或硫-sp3碳键的连接组成。这些连接可使用点击化学迅速完成。

[0007] 本发明还提供用于治疗或预防感染的化合物、组合物及其使用方法,例如通过平台确认的化合物。

[0008] 在一个实施方案中,本发明提供一种化合物,其包括通过任选的接头缀合至膜锚定部分(如疏水部分)的病毒刺突肽(也称融合肽)的一个、两个、三个或更多个HRC序列。疏水部分可以是膜整合配体,如胆固醇、鞘脂、糖脂、甘油磷脂。病毒刺突肽优选为冠状病毒刺突蛋白。本发明的肽抑制病毒融合。

[0009] 本发明包括用于递送本发明化合物的组合物,例如肺的或鼻的递送。本发明还提供一种治疗或预防需要其的受试者的病毒感染(包括,例如SARS-CoV-2(COVID-19)感染)的方法,其包括施用有效量的本发明化合物。本发明进一步提供生产本发明组合物的方法。

[0010] 在实施方案中,用于治疗冠状病毒的有用的抗病毒化合物包括具有如图1G、图1H或图1I所示式的本发明化合物。

[0011] 本发明旨在提供分子库的高效生产。可被生产的平台和库提供检测(interrogate)变体以确认那些具有提高的抗SARS-CoV2及其突变(包括但不限于α、β、γ、δ和o变体)的抗病毒活性的接头、间隔子、序列和靶向部分的能力。

附图说明

[0012] 本专利或申请文件包含至少一幅彩色图。具有彩色图的该专利或专利申请的复印件将依据请求和支付必要费用由专利局提供。

[0013] 本发明的前述和其他目的、特征和优点将从以下本发明优选实施方案的更多特定描述中显而易见,如附图中描述,其中相同的参考符号在不同视图中指代相同的部分。附图不一定是按比例的,而是重点放在描述本发明的原理上。

[0014] 图1A到图1H描绘了本发明的示例性化合物。

[0015] 图2描绘了假病毒中和试验的代表性示意图。

[0016] 图3示出了各种SARS-CoV2变体以及能找到它们的突变的区域。

[0017] 图4为来自如在Duquerroy等人,Virology(2005)335:276-285Duquerroy中描述的冠状病毒的HRC肽的模型。

[0018] 图5为S蛋白三聚体的横截面视图。

[0019] 图6描述了氨基酸侧链中各种原子的原子排序。

[0020] 图7为实施例2研究设计的示意图。

[0021] 图8描绘了体重变化的平均百分数(y轴),x轴对应从-1和-2(基线)到第7天的时间段。

[0022] 图9描绘了体重变化的百分数(y轴),x轴对应组治疗。针对对照组1的普通单因素方差分析(one-way ANOVA)与多重比较,如果存在P>0.05、*P≤0.05、**P≤0.01、***P≤0.001、****P≤0.0001,则显著差异用星号示出。

[0023] 图10描绘了从第1天到第7天(x轴)通过RT-qPCR的基因组拷贝数量(y轴通过Log_{10}标准化)的口腔拭子病毒载量估算。由于意外死亡,从第1天到第2天G1具有n=6。在那期间,从G2到G5的所有组具有n=8。从第3天到第7天,G1具有n=3,而G2到G5有n=4只动物。

[0024] 图11描绘了每天通过RT-qPCR在口咽拭子中的基因组拷贝数量(y轴通过Log_{10}标准化)的病毒载量估算,x轴对应组治疗。针对对照组1的普通单因素方差分析与多重比较,如果存在ns P>0.05、*P≤0.05、**P≤0.01、***P≤0.001、****P≤0.0001,则显著差异用星号示出。

[0025] 图12描绘了通过RT-qPCR在第2天(n=4)和第7天(n=4)收集的肺中的基因组拷贝数量(y轴通过Log_{10}标准化)的病毒载量估算,x轴对应组治疗。针对对照组1的普通单因素方差分析与多重比较,如果存在ns P>0.05、*P≤0.05、**P≤0.01、***P≤0.001或****P≤0.0001,则显著差异用星号示出。

[0026] 图13描绘了在研究第2天和第7天肺中的活SARS-CoV-2滴定试验。y轴上的肺组织$TCID_{50}$/mg使用Log_{10}标准化。图表示出了每组(x轴)所有个体动物的肺滴度和平均值。当通过$TCID_{50}$与对照组1相比,第2天组(2、3、4和5)病毒载量显著减少(**,P<0.01,或如果不显著

则不示出)。

[0027] 图14描绘了第2天和第7天鼻甲中的活SARS-CoV-2滴定试验。y轴上的鼻甲组织的TCID50/mg。图表示出了每组(x轴)所有个体动物的肺滴度和平均值。当通过$TCID_{50}$与对照组1相比,第2天组(2、3、4和5)病毒载量显著减少(**,P<0.01,或如果不显著则不示出)。

[0028] 图15为实施例3研究设计的示意图。

[0029] 图16描绘了体重变化的平均百分数(y轴),x轴对应研究第-1和-2天(基线)到第7天。

[0030] 图17描绘了体重变化的百分数(y轴),x轴对应组治疗。针对对照组1的普通单因素方差分析(one-way ANOVA)与多重比较,如果存在P>0.05、*P≤0.05、**P≤0.01、***P≤0.001、****P≤0.0001,则显著差异用星号示出。

[0031] 图18描绘了从第1天到第7天(x轴)通过RT-qPCR的基因组拷贝数量(y轴通过Log_{10}标准化)的口腔拭子病毒载量估算。

[0032] 图19描绘了每天通过RT-qPCR在口咽拭子中的基因组拷贝数量(y轴通过Log_{10}标准化)的病毒载量估算,x轴对应组治疗。普通单因素方差分析与对照组1多重比较,如果存在ns P>0.05、*P≤0.05、**P≤0.01、***P≤0.001、****P≤0.0001,则显著差异用星号示出。

[0033] 图20描绘了通过RT-qPCR在第2天(n=6)和第7天(n=6)收集的肺中的基因组拷贝数量(y轴通过Log_{10}标准化)的病毒载量估算,x轴对应组治疗。针对对照组1的普通单因素方差分析与多重比较,如果存在ns P>0.05、*P≤0.05、**P≤0.01、***P≤0.001或****P≤0.0001,则显著差异用星号示出。

[0034] 图21描绘了通过在第2天(n=6)和第7天(n=6)收集的肺中$TCID_{50}$(y轴通过Log_{10}标准化)的病毒载量估算,x轴对应组治疗。针对对照组1的普通单因素方差分析(one-way ANOVA)与多重比较,如果存在n.s.P>0.05、*P≤0.05、**P≤0.01、***P≤0.001或****P≤0.0001,无显著差异不示出,显著差异用星号示出。

[0035] 图22示出了根据本发明的抗病毒治疗性化合物对WA1株的功效。

[0036] 图23示出了根据本发明的抗病毒治疗性化合物对δ株的功效。

[0037] 图24示出了根据本发明的抗病毒治疗性化合物对o株的功效。

[0038] 图25示出了根据本发明的抗病毒治疗性化合物对P1株的功效。

[0039] 图26示出了根据本发明的抗病毒治疗性化合物对SARS-CoV-1株的功效。

[0040] 图27示出了根据本发明的抗病毒治疗性化合物对MERS-CoV株的功效。

[0041] 图28示出了根据本发明的抗病毒治疗性化合物对OC43株的功效。

具体实施方式

[0042] 冠状病毒通过附着于宿主细胞上的人血管紧张素转换酶2(hACE2)受体的刺突蛋白结合结构域(RBD)靶向人细胞。冠状病毒刺突(S)糖蛋白是通过识别宿主细胞受体和介导病毒膜与细胞膜融合在病毒感染中起着关键作用的病毒粒子的外包膜上的I类病毒融合蛋白。冠状病毒进入宿主细胞是由从病毒表面形成同源三聚体突出(protruding)的跨膜刺突(S)糖蛋白介导的。S包括负责结合至宿主细胞受体(S1亚基)以及病毒膜和细胞膜的融合(S2亚基)的两个功能亚基。

[0043] S1提供受体结合功能,并包含在N末端的信号肽(SP)、N末端结构域(NTD)和受体结

合结构域(RBD)。S2在利于细胞进入的膜融合中发挥功能,并且它包含融合肽(FP)结构域、内部融合肽(IFP)、两个七元重复结构域(HR1和HR2)、跨膜结构域和C末端结构域。

[0044] 结合后,刺突蛋白由宿主细胞跨膜蛋白酶/丝氨酸亚家族成员2(TMPRSS2)激活,并因此病毒经历与内体膜(endosomal membrane)融合以进入细胞。冠状病毒中的刺突蛋白的膜融合结构域高度保守,因此靶向膜融合可引起持久的长期疗法。

[0045] 本发明提供用于按需合成强力的抗冠状病毒材料的可编程快速响应平台。平台优选包括冠状病毒融合肽抑制剂、膜锚定部分和将肽共价连接至膜锚定部分的多聚体核心(B)。平台任选还包括刺突结合肽。平台任选还包括靶向肽,如ACE2靶向肽或受体结合结构域靶向肽。

[0046] 本发明的化合物可通过以下通式表征:

[0047] (肽-接头)n-B-疏水部分

[0048] 其中接头是任选的,其中B为将每个肽部分共价连接至疏水部分的多聚体核心并包括半胱氨酸、X和任选的Y和/或任选的Z,其中X、Y和Z为本文所定义;且其中n为选自1、2、3或更多的整数。在优选的实施方案中,化合物通过化学缀合作为离散组成部分(building block)的每个模块生产。点击化学被优选用于缀合。

[0049] 每个肽独立地为源自冠状病毒刺突蛋白的HRC肽和/或靶向肽,前提是有至少一种源自冠状病毒刺突蛋白的HRC肽。虽然本发明的优选实施方案使用天然或野生型肽,但也可使用非天然肽。例如,可将在一种或多种突变(如o突变)中发现的氨基酸与其他病毒(如δ病毒)的天然序列组合。所谓的HRC肽或冠状病毒刺突蛋白的区域是优选的。HRC肽抑制感染过程中重要早期步骤的病毒融合。野生型HRC肽为遍及冠状病毒蛋白的刺突或S蛋白的保守区域。融合区域(HRC/HRN)的保守本性和I类包膜病毒的机制使其成为开发泛冠状病毒(pan-coronavirus)抑制剂的理想靶。

[0050] 优选的,野生型HRC肽包括序列及其结合片段:

[0051] Ac_n-DISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQEL(SEQ ID NO:1),其中n为0或1。

[0052] 关于SEQ ID NO:1的HRC肽,氨基酸的常规编号从在D的1150开始。1151I、1154I和1158V是在疏水界面前融合中,且1159V被暴露。这些氨基酸稳定螺旋。当发生构象变化(如蛋白酶剪切释放FP)时,1158V被暴露,且1159V出现在与HRN三聚体相互作用的疏水表面中。1155N和1176N牵涉冠状病毒中保守的N-连接糖基化。前7个氨基酸牵涉HRN结合。“N-Cap”区域跨越1159V和1171V。1171V为冠状病毒中的保守疏水物且稳定HRC疏水核心并参与HRN相互作用。

[0053] 疏水核心跨越1161I和1175L且为螺旋前融合和后融合。异亮氨酸、亮氨酸和丙氨酸在卷曲螺旋的折叠和稳定性中是重要的。C-Cap区域跨越1176N和1185L。1179L、1182L和1185L是在疏水界面前融合,且1180I被暴露。这些氨基酸稳定螺旋。1185Y可牵涉三聚体卷曲螺旋中的三条多肽链之间的疏水包装。当发生构象变化(蛋白酶剪切释放FP)时,1179L被暴露,且1180I是在与HRN三聚体相互作用的疏水表面中。1164E和1184E在HRC和HRN之间形成盐桥。此外,1159V、1160N、1171V和1180I已示出在晶体结构中与HRN相互作用。图5描述了S蛋白三聚体的横截面视图。

[0054] 在某些实施方案中,肽选自野生型HRC肽的变体,野生型HRC肽包括以下序列及其结合片段:

[0055] Ac_n-DISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQEL(SEQ ID NO:1),

[0056] 其中n为0或1。

[0057] 在蛋白质变体的上下文中,术语“变体”定义为与野生型序列(例如SEQ ID NO:1或本文描述的其他天然序列)相比,具有至少一个氨基酸删除、添加或替换的肽。优选地,变体结合野生型序列的同源配体。例如,可使用其中SEQ ID NO:1中的1、2、3、4或5个氨基酸被替换的肽。如上述所示,这些替换的氨基酸优选选自通过序列比对在不同冠状病毒株中确认的一个或多个相应的氨基酸。例如,如上述提供的比对中描述的,可将一个或两个加下划线的异亮氨酸替换为亮氨酸和/或蛋氨酸。加下划线的丙氨酸可替换为缬氨酸、亮氨酸或异亮氨酸。一个或两个加下划线的亮氨酸可独立地替换为异亮氨酸、酪氨酸、丙氨酸或缬氨酸。还可选择其他保守或非保守替换(赖氨酸和谷氨酰胺或天冬氨酸和谷氨酸),例如,如上述序列比对中所示。在实施方案中,在2、3、4、5或更多种冠状病毒(例如从蝙蝠中分离的冠状病毒或SARS-CoV2突变体或变体)中保守的氨基酸在非天然HRC肽中仍然保守。

[0058] 例如,野生型HRC序列可在N-和/或C末端包括1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个产自S蛋白的额外氨基酸。例如,可在N末端添加甘氨酸。此外,野生型HRC肽片段可删除N-和/或C末端的1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸,并抑制感染。通常,总共删除不超过总计十个氨基酸。例如,可删除C末端的10个氨基酸,并期望保留抑制活性。

[0059] 在某些实施方案中,对野生型序列的修饰是期望的。例如,使用一个或多个D氨基酸可提高肽的药代动力学和半衰期。因此,在某些实施方案中,本发明包括由1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个D-氨基酸表征的肽。D-氨基酸优选可为野生型序列的相应L-氨基酸。在某些实施方案中,D-氨基酸是位于或靠近(例如在1、2或3个氨基酸内)蛋白酶降解位点的氨基酸。在某些实施方案中,D-氨基酸是参与与HRN肽结合的疏水氨基酸,并优选比相应的野生型序列具有更高的亲和力。可选地或另外地,D-氨基酸是亲水性氨基酸,如赖氨酸、天冬氨酸、谷氨酸或精氨酸。可选地或另外地,D-氨基酸可选自SEQ ID NO:1的N-末端的7个氨基酸。通过并入D-氨基酸改进的肽在于2021年1月22日提交的USSN 63/140,387中被描述,该专利申请通过引用以其全部并入本文。

[0060] 然而,用一个或多个D-氨基酸交换相应的L-氨基酸可改变肽的拓扑结构并影响功能。因此,优选的非天然HRC肽是反构型-反排列(Retro-Inversion)HRC肽或“RI HRC肽”。反构型-反排列HRC肽优选通过在标准结合试验中野生型HRC肽与其同源配体的至少约50%的结合亲和力和对哺乳动物蛋白酶降解降低的敏感性来表征。反构型反排列(Retroinversion)定义为反转(reversing)螺旋肽的D-肽序列或“翻转(flipping)”末端,从而对结合配体或靶恢复侧链的呈现。见Kim等人,Method to generate highly stable D-amino acid analogs of bioactive helical peptides using a mirror image of the entire PBS,PNAS,2018年2月13日,115(7)1505-1510,其通过引用以其全部并入本文。因此,本发明的非天然肽可包括具有SEQ ID NO:1序列的肽,其中氨基酸为D-氨基酸,例如在区域内的氨基酸,翻转N-末端为C-末端。例如,如SEQ ID NO:2所示N-末端可经过反构型反排列,SEQ ID NO:2中每个D-氨基酸前面为“d”:

[0061] dIdGdSdIdD NASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQEL(SEQ ID NO:2)

[0062] 此示例提供5个氨基酸的单一RI区域。然而,可选择少至两个氨基酸(例如,2个N-末端氨基酸)。例如,RI区域可跨越疏水核心1160N到1176N、或C-Cap区域或其部分。可选地,

整个肽可为RI肽。此外,可包括两个、三个或更多个RI区域。例如,N-末端和C-Cap区域都可为RI区域,用L-氨基酸保留疏水核心。

[0063] 例如,在使用镜像噬菌体展示来筛选HRC变体中,可从HRN冠状病毒肽或第一L-肽合成第一D-肽。第一L-肽可为天然存在的L-肽,或可为肽的嵌合体。方法还可包括筛选特异性结合至第一D-肽的HRC肽或第二L-肽;然后,可合成是第二L-肽的镜像的第二D-肽。在本文描述的D-肽筛选方法的一个方面,可先用D-氨基酸合成N-三聚体靶,生成天然L-N-三聚体靶的镜像。D-N-三聚体靶可用于标准的基于肽的筛选,如噬菌体展示、核糖体展示和/或CIS展示,以确认结合至D-N-三聚体的L-肽。然后可用D-氨基酸合成确认的L-肽。根据对称法则,产生的D-肽结合天然L-N-三聚体且将因此靶向冠状病毒HRN中间体的N-三聚体区域,从而抑制感染。该筛选方法也在Schumacher等人,Identification of D-peptide ligands through mirror-image phage display,Science,1996年3月29日;271(5257):1854-7中描述,其借此通过引用以其全部并入本文。

[0064] HRC肽的热点残基可通过HRC肽的晶体结构或NMR溶液结构确认。例如,选自1150D、1151I、1154I、1155N、1158V、1159V、1161I、1164E、1171V、1175L、1176L、1179L、1180I、1182L、1184E和/或1185Y的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个氨基酸,例如选自SEQ ID NO.1的1159V、1160N、1163E、1171V、1180I、1184E和/或1185L的一个或多个氨基酸,可被指定为热点残基。

[0065] 在实施方案中,肽包括细胞靶向肽。在实施方案中,靶向肽选自但不限于ACE2靶向肽或受体结合结构域靶向肽。在实施方案中,靶向肽为ACE2靶向肽。在实施方案中,靶向肽为受体结合结构域靶向肽。

[0066] 在化合物仅包括一个肽的实施方案中,肽为源自冠状病毒刺突蛋白的HRC肽。在包括2个或多个肽的实施方案中,每个肽可为源自冠状病毒刺突蛋白的HRC肽。在包括2个或多个肽的实施方案中,肽可选自源自冠状病毒刺突蛋白的HRC肽和/或靶向肽,前提是至少有一个源自冠状病毒刺突蛋白的HRC肽。优选地,只有一个肽是靶向肽且其他肽是源自冠状病毒刺突蛋白的HRC肽。

[0067] 在某些实施方案中,任选的“接头”被定义为共价结合至肽(优选在其C或N末端)和结合至B的双价部分或基团。在实施方案中,接头可具有1、2、3、4、5或更多个亚基或区段。在实施方案中,接头包括具有一个或多个氨基酸的亚基。氨基酸可为天然存在的或合成的。因此,接头可包括(Gly)n+1、(GlySerGly)n或(Gly-Pro)n,其中n为1或更大,例如1至12、1至6或1至4。GlySerGly为可形成接头或部分接头的氨基酸序列的一个示例。

[0068] 在某些实施方案中,接头可包括非氨基酸亚基。在一些实施方案中,接头的非氨基酸亚基的示例是-(OCH_2CH_2)m-,其中m为1至15,例如2至10、2至6或4。引入(聚)乙二醇基团有助于在水介质中的溶解度。在一些实施方案中,接头的非氨基酸部分的示例是-$CH_2C(O)$-和-$CH_2C(O)NHCH_2CH_2(OCH_2CH_2)_4C(O)$-。

[0069] 例如,使用有3个亚基的接头可能是有利的。第一任选亚基包括柔性肽,如-$(G)_m$-或-$(GS)_mG$-,其中m为1、2、3、4、5或更多的整数,例如2。第二亚基可为化学反应(如点击化学反应)的残基,如涉及肽或第一亚基的N-末端、C-末端或侧链的肽键、酯、醚或硫醚。残基可以是非裂解的,如用碳二亚胺或巯基马来酰亚胺形成的。第三任选亚基可以是亲水性间隔物,如聚乙二醇、聚乙烯亚胺、聚乙缩醛聚合物、聚(1-羟甲基乙烯基羟甲基-缩醛)(PHF)或

碳水化合物。亲水性间隔物通常可以是聚合的且包括1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个单体。有4个单体(PEG4)的聚乙二醇是满意的。亲水性间隔物的长度可对应于S蛋白间隙的跨度,以便于定位肽以结合HRN结构域。PEG还可减少聚集并提高溶解度。另一亚基可以为位于B和接头或其亚基之间的化学反应(如点击化学反应)的残基。

[0070] B可以是提供将一个或多个肽-接头部分共价连接到疏水部分的框架的多聚体核心。B可包括一个或多个半胱氨酸、一个或多个X和任选的Y和/或任选的Z,其中X、Y和Z为本文所定义。在实施方案中,一个或多个半胱氨酸将一个或多个肽-接头部分结合到B的其他组分。

[0071] 存在能够使用精细可调且简单的化学反应将肽共价连接到B的需要,该化学反应对细胞无毒,可在生物学条件下快速发生。本发明解决此需求。广泛来说,本公开提供通过点击化学进行反应的点击化学兼容的官能团(本文也称作“点击化学手柄(click chemistry handle)”)。

[0072] 如本文所用,应理解“点击化学兼容的”结构、官能团、单体、寡聚物等指通过包括一个或多个适合参与点击化学反应的化学部分进行结构表征的化合物、材料等。

[0073] 点击化学手柄是提供可参与点击化学反应的反应基团的化学部分。点击化学反应和适合的点击化学反应的化学基团为本领域技术人员所熟知,且包括但不限于末端的炔烃、叠氮、应力炔烃(strained alkynes)、双烯、亲二烯体、烷氧基胺、羰基、磷化氢、酰肼、硫醇和烯烃。例如,在一些实施方案中,叠氮和炔烃用于点击化学反应。

[0074] 本发明的一些方面提供了修饰的肽,例如包括C末端或N末端点击化学手柄的蛋白质。然后这些肽可共价缀合至包括可与蛋白质的点击化学手柄反应的部分的B。

[0075] 在如本文公开的铜催化的叠氮-炔烃环加成(CuAAC)是用于功能化材料的点击化学的实施方案中,“点击化学兼容的”化合物包括末端炔烃和/或末端叠氮官能团。

[0076] 示例性的点击化学反应是CuAAC,尽管熟练的技术人员将理解其他将被理解为等同于CuAAC的点击化学兼容反应可在不偏离本文描述的发明概念的范围的情况下采用。例如,在各种实施方案中,点击化学兼容反应可包括CuAAC、应力促进的叠氮-炔烃环加成(SPAAC)、应力促进的炔烃-硝酮环加成(SPANC)、应力烯烃反应如烯烃-叠氮环加成等。点击化学兼容反应也可被视为包括烯烃-四氮唑逆需求狄尔斯-阿尔德反应(alkene-tetrazine inverse-demand Diers-Alder reactions)、烯烃-四唑光点击反应、硫醇的迈克尔加成(Michael additions of thiols)、硫醇与胺的亲核取代,以及某些狄尔斯-阿尔德反应等,比如由Becer,等人“Click chemistry beyond metal-catalyzed cycloaddition.” Angew.Chem.Int.Ed.2009,48:p.4900-4908公开的以及如由本领域普通技术人员在阅读本公开将理解的其等同物。

[0077] 因此,应理解点击化学兼容的基团、化合物等包括一个或多个适合的化学部分,其在各种实施方案中传递参与前述示例性点击化学的任意组合的能力。

[0078] B是提供将一个或多个肽-接头部分共价连接到疏水部分的框架的多聚体核心。B包括一个或多个半胱氨酸残基、一个或多个X和任选的Y和/或任选的Z,其中X、Y和Z为本文所定义。

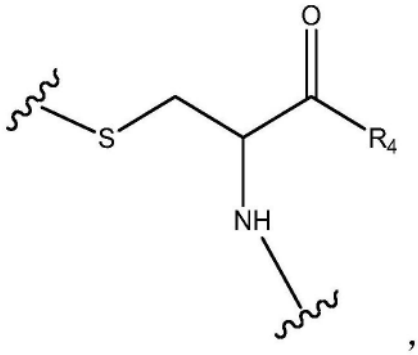
[0079] 一个或多个半胱氨酸残基、一个或多个X、任选的Y和任选的Z可为任何顺序,其中首先列出的B的组分结合到肽-接头,且最后列出的组分结合到疏水部分。例如,其中B按顺

序包括一个或多个半胱氨酸残基、一个或多个X和Z,肽-接头结合到一个或多个半胱氨酸且Z结合到疏水部分。在实施方案中,B按顺序包括一个或多个半胱氨酸和一个或多个X。在实施方案中,B包括半胱氨酸和X。

[0080] 在实施方案中,B包括一个或多个半胱氨酸、一个或多个X和Z。在实施方案中,B包括Z、一个或多个半胱氨酸和一个或多个X。

[0081] 在实施方案中,B包括Y、一个或多个半胱氨酸和一个或多个X。在实施方案中,B包括Y、一个或多个半胱氨酸、一个或多个X和Z。

[0082] 在实施方案中,一个或多个半胱氨酸将一个或多个肽-接头部分结合到B的其他组分。在一些实施方案中,一个或多个半胱氨酸通过硫醚键附接到一个或多个X。在实施方案中,一个或多个半胱氨酸具有以下结构:

[0083] 

其中R_4为OH或NH_2。

[0084] 在实施方案中,X包括一个或多个硫芳基连接、氮芳基连接或其他连接,如三唑、酰胺、硫-sp3碳键或亲水性接头。在实施方案中,亲水性接头选自如聚乙二醇(PEG)、聚乙烯亚胺、聚缩醛聚合物、聚(1-羟甲基乙烯羟甲基-甲醛)(PHF)或碳水化合物。在实施方案中,亲水性接头可以是聚合的并包括1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多种单体。在实施方案中,亲水性接头是聚乙二醇(PEG)。在实施方案中,亲水性接头为含有4个单体的聚乙二醇(PEG4)。在一个实施方案中,X包括一个或多个硫芳基连接。在一个实施方案中,X包括一个或多个氮芳基连接。在一个实施方案中,X包含一个或多个硫-sp3碳键。

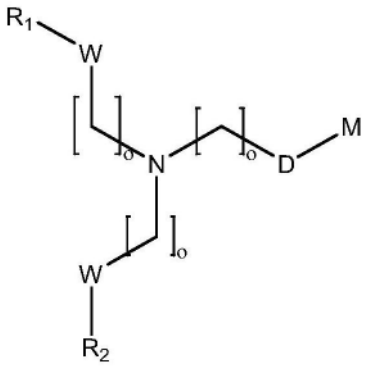
[0085] 在实施方案中,一个或多个X通过硫醚键直接与疏水部分附接。在实施方案中,一个或多个X附接到Z(当存在时),然后Z附接到疏水部分。

[0086] 在某些实施方案中,B还包括Y。在实施方案中,当Y存在时,Y来自一个或多个肽-接头部分与一个或多个半胱氨酸之间并将一个或多个肽-接头部分与一个或多个半胱氨酸结合,然后一个或多个半胱氨酸结合到B的其他组分。

[0087] 在实施方案中,Y包括一个或多个氨基酸。氨基酸可以是天然存在的或合成的。Y可包括一个或多个氨基酸,例如1至12、1至6或1至4个。一个或多个氨基酸可逐步地添加到接头。例如,第一氨基酸被添加到B的半胱氨酸,然后在添加第二氨基酸之前,肽-接头被附接到第一氨基酸。在肽-接头附接到第一氨基酸后,随后的氨基酸被附接到前一个氨基酸上,并允许进一步的肽-接头的附接,依此类推。在一些实施方案中,接头的氨基酸为一个或多个赖氨酸。

[0088] 在实施方案中,当Z存在时,Z来自X与疏水部分之间,并将B结合到疏水部分。

[0089] 在实施方案中,当Z存在时,Z包括具有根据式(I)结构的部分:

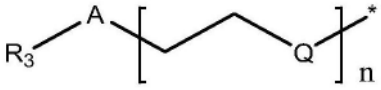
[0090] 

(I)

[0091] 其中,R1和R2各自独立地选自由以下组成的组:

[0092] (i)R_3;

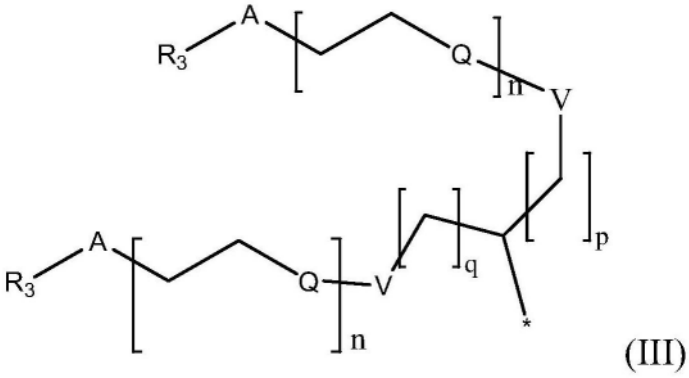
[0093] (ii)根据式(II)的结构:

[0094] 

(II)

[0095] 和

[0096] (iii)根据式(III)的结构:

[0097] 

(III)

[0098] 其中,

[0099] W在每个实例中独立地选自-H-C(O)-O-、-O-C(O)-H-、-C(O)-O-、-O-C(O)-、-(CH2)m-、-H-C(O)-、-C(O)-H-、-H-和-C(X)-,最优选的W为-C(O)-H-;

[0100] V在每个实例中独立地选自-$(CH_2)_m$-、-$(CH_2)_m$-C(X)-H-、-H-C(X)-$(CH_2)_m$-、-$(CH_2)_m$-H-C(O)-O-、-O-C(O)-H-$(CH_2)_m$-、-$(CH_2)_m$-C(O)-O-、-O-C(O)-$(CH_2)_m$-、-H-C(X)-、-C(X)-H-、-H-C(O)-O-、-O-C(O)-H-、-C(O)-O-和-O-C(O)-,最优选的V为-CH_2CH_2-C(O)-H-;

[0101] D在每个实例中为O、S或H;

[0102] A在每个实例中独立地选自-C(O)CH_2-、-CH_2C(O)-、-HCH_2-、-CH_2H-、-HC(O)-、-C(O)H-、-H-、-CH_2-、-CH_2C(O)H-和-HC(O)CH_2-;最优选的Y为-HCH_2-;

[0103] Q在每个实例中独立地选自-CH_2-、-H-、-O-、-CH_2O-、-HCH_2-和-OCH_2-,最优选的Z为-O-;

[0104] R3在每个实例中独立地选自任意所述多肽,这些多肽可相同或不同;

[0105] m在每个实例中独立地选自0到5之间的整数,即0、1、2、3、4或5;优选在0到3之间,优选地,m在每个实例中相同;

[0106] n在每个实例中独立地选自0到40之间的整数,即0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、

12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39或40;优选在3到10之间,优选地,n在每个实例中相同;

[0107] o在每个实例中独立地选自0到5之间的整数,即0、1、2、3、4或5;优选为2,优选地,o在每个实例中相同;

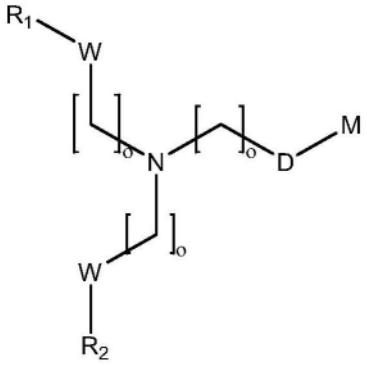
[0108] p在每个实例中独立地选自0到5之间的整数,即0、1、2、3、4或5;优选在0到3之间,优选地,p在每个实例中相同;

[0109] q在每个实例中独立地选自0到5之间的整数,即0、1、2、3、4或5;优选在0到3之间,优选地,q在每个实例中相同和/或优选q<p;

[0110] M为所述疏水部分;以及

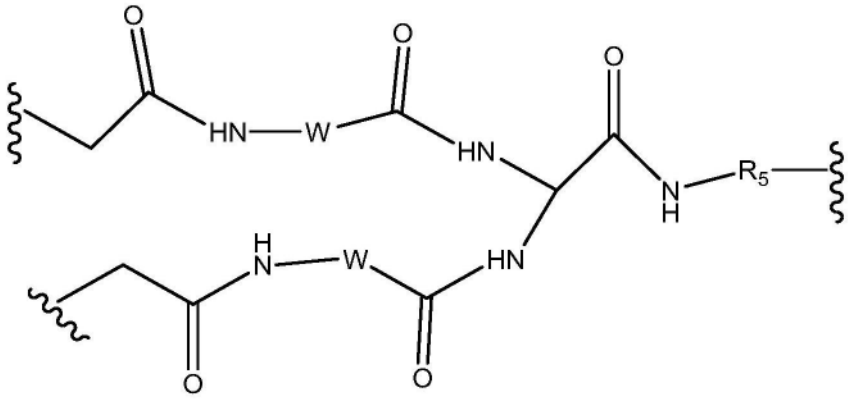
[0111] 其中*标记结构(II-III)与结构(I)连接的位置。

[0112] 在实施方案中,当Z存在时,Z不包括具有根据式(I)结构的部分:

[0113] 

(I)

[0114] 在实施方案中,当Z存在时,Z包括具有根据式(IV)结构的部分:

[0115] 

(IV),

[0116] 其中,R_5选自亲水性接头,亲水性接头选自如聚乙二醇(PEG)、聚乙烯亚胺、聚缩醛聚合物、聚(1-羟甲基乙烯羟甲基-甲醛)(PHF)或碳水化合物;以及

[0117] W在每个实例中独立地选自直接键,亲水性接头选自如聚乙二醇(PEG)、聚乙烯亚胺、聚缩醛聚合物、聚(1-羟甲基乙烯羟甲基-甲醛)(PHF)或碳水化合物。

[0118] 在实施方案中,R_5的亲水性接头可以是聚合的并包括1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多种单体。在实施方案中,R_5的亲水性接头为聚乙二醇(PEG)。在实施方案中,R_5的亲水性接头为有4个单体的聚乙二醇(PEG4)。

[0119] 在实施方案中,W的亲水性接头在每个实例中可独立地为聚合的并包括1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多单体。在实施方案中,亲水性接头为聚乙二醇(PEG)。在实施方案中,W的亲水性接头在每个实例中可独立地为有4个单体的聚乙二醇(PEG4)。

[0120] 疏水部分可为膜整合脂质,如胆固醇、鞘脂类、鞘磷脂、糖脂、甘油磷脂(如磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺和磷脂酰丝氨酸)、麦角固醇、7-二氢胆固醇和豆甾醇。优选为胆固醇。通常,B直接或间接地连接到胆固醇羟基基团,如3-OH。疏水部分有利于将本发明的化合物插入细胞膜中,并可抑制病毒进入。

[0121] B可连接到疏水部分上的任何便利位置。在一些实施方案中,连接可为通过疏水部分的羟基基团。例如,当疏水部分为胆固醇时,B可通过基团-C(O)-或-C_{1-4}亚烷基(alkylene)C(O)-(如-CH_2C(O)-)连接到胆固醇。

[0122] 磷脂包括如鸡蛋磷脂酰胆碱(EPC)、鸡蛋磷脂酰甘油(EPG)、鸡蛋磷脂酰肌醇(EPI)、鸡蛋磷脂酰丝氨酸(EPS)、磷脂酰乙醇胺(EPE)和磷脂酸(EPA)这样的脂质;大豆对应物,大豆磷脂酰胆碱(SPC);SPG、SPS、SPI、SPE和SPA;氢化鸡蛋(hydrogenated egg)和大豆对应物(如HEPC、HSPC),其他磷脂,其由在甘油位置的2和3位包含12到26个碳原子的链的脂肪酸的酯连接和在甘油的1位置包括胆碱、甘油、肌醇、丝氨酸、乙醇胺的不同头部基团构成,以及相应的磷脂酸。这些脂肪酸上的链可为饱和的或不饱和的,且磷脂可由不同链长度和不同不饱和度的脂肪酸构成。特别地,制剂的组合物可包括二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC),这是天然存在的肺表面活性剂的主要成分。其他示例包括二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC)和二肉豆蔻酰磷脂酰甘油(DMPG)、二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPQ)和二棕榈酰磷脂酰甘油(DPPG)、二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPQ)和二硬脂酰磷脂酰甘油(DSPG)、二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)和如棕榈酰硬脂酰磷脂酰胆碱(PSPC)和棕榈酰硬脂酰磷脂酰甘油(PSPG)的混合磷脂,以及如单油酰磷脂酰乙醇胺(MOPE)的单酰化磷脂。

[0123] 胆固醇类可包括胆固醇、胆固醇酯(其包括胆固醇半琥珀酸酯)、胆固醇盐(其包括胆固醇氢硫酸盐和胆固醇硫酸盐)、麦角固醇、麦角固醇酯(其包括麦角固醇半琥珀酸酯)、麦角固醇盐(其包括麦角固醇氢硫酸盐和麦角固醇硫酸盐)、羊毛甾醇、羊毛甾醇酯(其包括羊毛甾醇半琥珀酸酯)、羊毛甾醇盐(其包括羊毛甾醇氢硫酸盐和羊毛甾醇硫酸盐)。生育酚类可包括生育酚、生育酚酯包括生育酚半琥珀酸酯、生育酚盐包括生育酚氢硫酸盐和生育酚硫酸盐。

[0124] 在实施方案中,本发明的化合物具有图1H所示的结构(也称作“Decoy 101”或“DCOY101”)。

[0125] 在实施方案中,本发明的化合物具有图1I所示的结构(也称作“Decoy 102”或“DCOY102”)。

[0126] 在实施方案中,本发明的化合物具有图1G所示的结构(也称作“Decoy 103”或“DCOY103”)。

[0127] DCOY102接头和DCOY103新接头提供超过DCOY101的提高的稳定性。此外,DCOY102和DCOY103在PBS缓冲剂中示出提高的溶解度,如下:Decoy 101:~0.04mg/mL=0.004mM;Decoy 102:~0.35mg/mL=0.035mM;Decoy 103:~0.19mg/mL=0.018mM。

[0128] 本发明的组合物包括如本文描述的化合物和药学上可接受的载体。例如,组合物可全身或局部施用。例如,组合物可以口服、静脉内、肌肉内、直肠、皮肤、皮下、局部、经皮、舌下、鼻的、吸入或阴道递送施用。因此,组合物可为例如片剂、胶囊、药丸(pill)、粉末、颗粒、悬液、乳液、溶液、凝胶(包括水凝胶)、糊剂、软膏、乳膏、膏药(plaster)、灌洗剂(drench)、渗透给药装置、栓剂、灌肠剂(enema)、注射剂、植入剂、喷雾剂或气雾剂的形式。

组合物可根据传统的药物实践配制(见如Remington:The Science and Practice of Pharmacy,22nd edition,2013,ed.L.V.Allen,Pharmaceutical Press,Philadelphia,and Encyclopedia of Pharmaceutical Technology,4.sup.th Edition,ed.J.Swarbrick,2013,CRC Press,New York)。

[0129] 化合物可以以多种本领域已知的方式进行配制。例如,本发明的一种或多种化合物和任何额外的生物活性剂(如果存在,如本文定义的)可一起或单独配制。

[0130] 本发明的每种化合物单独或与如本文描述的一种或多种活性剂联合可配制成控释(例如,持续或定量(measured))施用,如在美国专利申请公开号2003/0152637和2005/0025765中描述的,每个均通过引用并入本文。例如,本发明的化合物单独或与如本文描述的一种或多种生物活性剂联合可被并入施用于患者的胶囊或片剂中。

[0131] 本领域已知的控释制剂包括特定包衣的小球(pellet)、用于手术插入的聚合物制剂或基质、或作为持续释放的微粒(例如用于植入、插入、输注或注射的微球或微胶囊),其中活性药物的缓释通过基质的持续或控制扩散出和/或制剂包衣的选择性分解或聚合物基质的选择性分解带来。用于将试剂控制、持续或立即递送到患者的优选局部位点的其他制剂或媒介物包括例如悬液、乳液、凝胶、脂质体以及任何其他用于皮下或肌肉内施用的可接受的适合的本领域已知的递送媒介物或制剂。

[0132] 适合的生物相容性聚合物可用作控释材料。聚合材料可包括生物相容性聚合物、可生物降解聚合物,以及在某些优选实施方案中,优选为乳酸和乙醇酸的共聚物。在本发明制剂中有用的优选控释材料包括聚酐、聚酯、乳酸和乙醇酸的共聚物(优选其中乳酸与乙醇酸的重量比不超过4:1,即80%或更少的乳酸与20%或更多的乙醇酸),以及含有催化剂或降解增强化合物的聚邻酯,例如含有按重量计至少1%的酸酐催化剂(如马来酸酐)。聚酯的示例包括聚乳酸、聚乙醇酸和聚乳酸-聚乙醇酸共聚物。其他有用的聚合物包括蛋白质聚合物如胶原蛋白、明胶、纤维蛋白和纤维蛋白原以及多糖(如透明质酸)。

[0133] 在额外的实施方案中,用于本发明化合物作为载体有效的控释材料还可包括生物粘附性聚合物如果胶(聚半乳糖醛酸)、黏多糖(透明质酸、黏蛋白)或无毒凝集素,或聚合物本身可以为生物粘附剂(bioadhesive),例如聚酐或多糖(如壳聚糖)。在可生物降解聚合物包括凝胶的实施方案中,一种这样有用的聚合物为热凝胶聚合物,例如聚氧乙烯、聚氧丙烯(PEO-PPO)嵌段共聚物,如来自BASF Wyandotte的PLURONIC.TM.F127。

[0134] 用于口服用途的制剂包括含有与无毒药学上可接受的赋形剂混合的活性成分的片剂。这些赋形剂可为例如惰性稀释剂或填充剂(如蔗糖、山梨醇、糖、甘露醇、微晶纤维素、淀粉(包括马铃薯淀粉)、碳酸钙、氯化钠、乳糖、磷酸钙、硫酸钙或磷酸钠);造粒和崩解剂(如纤维素衍生物(包括微晶纤维素)、淀粉包括(马铃薯淀粉)、交联羧甲基纤维素钠、海藻酸盐或海藻酸);粘合剂(如蔗糖、葡萄糖、山梨醇、阿拉伯胶、海藻酸、海藻酸钠、明胶、淀粉、预胶化淀粉、微晶纤维素、镁铝硅酸盐、羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、乙基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮或聚乙二醇);以及润滑剂、滑剂和抗粘剂(如硬脂酸镁、硬脂酸锌、硬脂酸、二氧化硅(silicas)、氢化植物油或滑石粉)。其他药学上可接受的赋形剂可为着色剂、调味剂、增塑剂、保湿剂、缓冲剂、掩味剂(如羟丙基甲基纤维素、羟丙基纤维素)等。

[0135] 本发明的一种或多种化合物可一起混合在片剂、胶囊或其他媒介物中,或者可分

开。在一个示例中,本发明的化合物包含在片剂的内部,且生物活性剂在片剂的外部,使得生物活性剂的大部分在本发明的化合物释放之前被释放。

[0136] 用于口服的制剂也可作为咀嚼片提供,或作为硬明胶胶囊,其中活性成分与惰性固体稀释剂(例如,马铃薯淀粉、乳糖、微晶纤维素、碳酸钙、磷酸钙或高岭土)混合,或作为软明胶胶囊,其中活性成分与水或油介质(例如花生油、液体石蜡或橄榄油)混合。粉末、颗粒和小球可使用片剂和胶囊中的上述成分以常规方式,使用例如混合器、流化床装置或喷雾干燥仪器制备。口腔制剂也可作为漱口水、口腔喷雾、口腔冲洗液、口腔软膏或口腔凝胶提供。

[0137] 通过化合物的片剂、胶囊、小球或颗粒制剂的适当包衣,或将化合物并入适当基质中可实现溶解或扩散控释。控释包衣可包括上述一种或多种包衣物质和/或,例如虫胶、蜂蜡、糖蜡(glycowax)、蓖麻蜡、巴西棕榈蜡(carnauba wax)、硬脂醇、单硬脂酸甘油酯、二硬脂酸甘油酯、棕榈酸硬脂酸甘油酯、乙基纤维素、丙烯酸树脂、dl-聚乳酸、醋酸丁酸纤维素、聚氯乙烯、聚乙酸乙烯酯、乙烯基吡咯烷酮、聚乙烯、聚甲基丙烯酸酯、甲基丙烯酸甲酯、2-羟基甲基丙烯酸酯、甲基丙烯酸酯水凝胶、1,3-丁二醇、乙二醇甲基丙烯酸酯和/或聚乙二醇。在控释基质制剂中,基质材料还可包括例如水合甲基纤维素、巴西棕榈蜡和硬脂醇、卡波姆934、硅酮、甘油三硬脂酸酯、甲基丙烯酸酯-甲基丙烯酸甲酯、聚氯乙烯、聚乙烯和/或卤化氟碳(halogenated fluorocarbon)。

[0138] 可用于口服施用并入本发明的化合物和组合物的液体形式包括水溶液、适合的调味糖浆、水性或油性悬液和具有可食用油(如棉籽油、芝麻油、椰子油或花生油)的调味乳,以及酏剂和类似的药物媒介物。

[0139] 适用于肠外施用(例如,通过注射)的制剂包括水性或非水性、等渗、无热原、无菌液体(例如,溶液、悬液),其中化合物被溶解、悬浮或以其他方式提供(例如,在脂质体或其他微粒中)。这些液体可额外包含其他药学上可接受的成分,如抗氧化剂、缓冲剂、防腐剂、稳定剂、抑菌剂、悬浮剂、增稠剂和使制剂与预期接受者的血液(或其他相关体液)等渗的溶质。赋形剂的示例包括,例如,水、醇(alcohol)、多元醇、甘油、植物油等。用于这些制剂的合适等渗载体的示例包括氯化钠注射液、林格氏液或乳酸林格氏注射液。通常,化合物在液体中的浓度为约1ng/ml至约10μg/ml,例如约10ng/ml至约1μg/ml。制剂可以以单位剂量或多剂量密封容器呈现,例如安瓿和小瓶,并且可以以冻干(冷冻干燥)条件储存,仅需要在使用前立即加入无菌液体载体,例如注射用水。可从无菌粉末、颗粒和片剂制备临时注射溶液和悬液。

[0140] 本发明的组合物可包括适合鼻施用的液体媒介物。媒介物优选为水溶液。更优选地,媒介物为包括粘度增强剂,任选地一种或多种额外的赋形剂(其例如,提高制剂稳定性和/或施用时的舒适度)的水溶液。

[0141] 多种粘度增强剂在本领域中是已知的。粘度增强剂包括亲水性聚合物,如多糖、多糖衍生物、蛋白质和合成聚合物。示例包括但不限于阿拉伯胶、黄蓍胶、海藻酸、角叉菜胶、刺槐豆胶、瓜尔胶、明胶、透明质酸、聚丙烯酸盐、聚丙烯酸盐/烷基丙烯酸酯共聚物、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、淀粉、丙二醇藻酸酯、麦芽糊精和纤维素醚衍生物(如甲基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羟丙基纤维素和羧甲基纤维素)。尽可能时,优选前述任何盐形式。优选的粘度增强剂包括透明质酸(包括透明质酸钠);羧甲基纤维素,包括羧甲基纤

维素钠和羧甲基纤维素钙;甲基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基甲基纤维素和羟丙基纤维素。

[0142] 组合物任选地包括一种或多种额外赋形剂,其例如增加施用便捷性、受试者舒适度或组合物稳定性。适合的额外赋形剂包括但不限于张力调节剂,如氯化钠和右旋糖;抗氧化剂,如丁基羟基茴香醚;缓冲剂,如碳酸氢钠、柠檬酸钠和磷酸钠;防腐剂,如苯扎氯铵、乙醇、丙二醇、苯甲醇、苯乙醇、氯丁醇或羟苯甲酯;pH调节剂,如盐酸、硫酸和氢氧化钠;表面活性剂,如聚山梨酯80、聚山梨酯20和聚氧400硬脂酸酯;螯合剂,如乙二胺四乙酸二钠;抗氧化剂;共溶剂,如乙醇、PEG 400和丙二醇;渗透增强剂,如油酸;以及保湿剂,如甘油(参见S.Thorat,Sch.J.App.Med.Sci.2016,4(8D):2976-2985;D.Marx等人,IntechOpen,DOI:10.5772/59468.从以下可得:intechopen.com/books/drug-discovery-and-development-from-molecules-to-medicine/intranasal-drug-administration-an-attractive-delivery-route-for-some-drugs)。

[0143] 在一个实施方案中,媒介物由透明质酸钠、芦荟、尿囊素、氯化钠、碳酸氢钠、甘油(glycerin)、丙二醇、苯扎氯铵和USP级纯化水组成。合适的媒介物是由NEILMED™以商品名NASOGEL™销售的。

[0144] 组合物中活性剂的量可变化,例如,从按重量计约0.5%到按重量计约25%。

[0145] 制剂的pH在鼻腔中是可耐受的,且优选至少约8.0。可在制剂中使用的缓冲剂包括但不限于磷酸盐、TRIS、[三(羟甲基)甲基氨基]丙磺酸、2-(双(2-羟乙基)氨基)乙酸和N-[三(羟甲基)甲基]甘氨酸以及碱性缓冲剂(Seachem)。

[0146] 适用于鼻或肺施用的药物组合物包括选自由丙二醇、甘油、聚乙二醇及其组合组成的组的水溶性溶剂。组合物还可包括一种或多种多糖胶、非离子表面活性剂和防腐剂。示例性多糖胶是菌类植物胶(sclerotium gum)。示例性表面活性剂是泊洛沙姆,包括但不限于泊洛沙姆188。防腐剂可为例如苯扎氯铵。

[0147] 组合物可为干粉,且干粉通过干粉吸入器递送,干粉在推进剂中或水性悬液或溶液中悬浮且通过雾化器递送。

[0148] 例如,活性剂和肺赋形剂(如乳糖)的溶液或悬液可被喷雾干燥以形成具有足够细小颗粒级分的颗粒以递送到肺部或上呼吸系统。可选地,可将水溶液或悬液超声,从而使溶液/悬液雾化成可吸入的液滴大小,例如通过雾化器。

[0149] 赋形剂包括碳水化合物(包括单糖、二糖和多糖)。例如,单糖,如右旋糖(无水和一水合物)、半乳糖、甘露醇、D-甘露糖、山梨醇、山梨糖等;二糖,如乳糖、麦芽糖、蔗糖、海藻糖等;三糖,如棉子糖等;以及其他碳水化合物,如淀粉(羟乙基淀粉)、环糊精和麦芽糊精。适合本发明使用的其他赋形剂(包括氨基酸)为本领域中已知,如那些在WO 95/31479、WO 96/32096和WO 96/32149中公开的。碳水化合物和氨基酸的混合物也在本发明的范围内。包括无机(例如氯化钠等)、有机酸和它们的盐(例如羧酸及其盐如柠檬酸钠、抗坏血酸钠、葡萄糖酸镁、葡萄糖酸钠、氨丁三醇盐酸盐等)以及缓冲剂也被考虑。

[0150] 组合物可以以干粉形式或包含非水相的稳定分散剂形式使用。因此,本发明的分散剂或粉末可与定量吸入器(MDIs)、干粉吸入器(DPIs)、喷雾器、雾化器或液体剂量滴注(LDI)技术结合使用,以提供有效的药物递送。对于吸入疗法,本领域技术人员将理解,本发明的中空和多孔微粒特别适用于DPI。常规DPI包括粉末制剂和设备,其中预定剂量的药物

单独或与乳糖载体颗粒混合使用作为用于吸入的干粉气溶胶递送。

[0151] 药物以使药物能容易地分散成离散颗粒的方式配制,所述离散颗粒具有特征范围约0.5-10微米的粉末质量中值空气动力学直径,优选范围为约0.5-5.0微米MMAD。

[0152] 如上讨论,本文公开的稳定分散剂也可通过雾化(例如使用定量吸入器)施用到患者的鼻或肺气道。MDI在本领域是众所周知的且可容易用于施用要求保护的分散剂而无需过度实验。呼吸激活型MDI以及包含已开发或将开发的其他类型的改进的那些MDI也与稳定分散剂和本发明兼容,因此被认为在其范围内。然而,应强调的是,在优选实施方案中,稳定分散剂可使用多种不同途径以MDI施用,包括但不限于局部、鼻、肺或口腔。本领域技术人员将理解,这些途径是众所周知的,并且给药和施用程序可容易地推导用于本发明的稳定分散剂。

[0153] 除了前述实施方案外,本发明的稳定分散剂还可与如PCT WO 99/16420中公开的雾化器配合使用,PCT WO 99/16420的公开内容特此通过引用以其全部并入,以便提供可施用到需要其的患者的肺气道的气雾药物。雾化器在本领域中是众所周知的且可容易用于要求保护的分散剂的施用而无需过度实验。呼吸激活型雾化器以及包含已开发或将开发的其他类型的改进的那些雾化器也与稳定分散剂和本发明兼容,并被认为在本发明范围内。

[0154] 除了DPI、MDI和雾化器外,将理解本发明的稳定分散剂还可与液体剂量滴注或LDI技术配合使用,如例如在WO 99/16421中所公开的,WO 99/16421特此通过引用以其全部并入。液体剂量滴注涉及将稳定分散剂直接施用到肺。在这方面,生物活性化合物的直接肺部施用在治疗病症(特别是肺部病变部分血管循环不良降低静脉药物递送效果)中特别有效。关于LDI,稳定分散剂优选与部分液体换气(ventilation)或全部液体换气配合使用。此外,本发明还可包括在施用前、在施用期间或在施用后引入治疗有益量的生理可接受的气体(如一氧化氮或氧)至药物微分散剂中。

[0155] 使用方法

[0156] 本发明还包括使用本发明组合物用于治疗或预防需要其的受试者中的感染的方法。方法包括向受试者施用有效量的组合物的步骤。感染可为胃肠道或上呼吸道或下呼吸道的感染,包括普通感冒、流感、呼吸合胞病毒感染、严重急性呼吸综合征、中东呼吸综合征、COVID-19或由另一新兴人畜共患病毒(如人畜共患冠状病毒)引起的疾病。在特定方面,本发明的方法治疗病毒性呼吸道感染,如SARS-CoV-2(COVID-19)呼吸道感染。

[0157] 在一个实施方案中,本发明提供一种用于治疗需要其的受试者中由SARS-CoV-2变体引起的呼吸道感染的方法。在实施方案中,方法包括向受试者施用有效量的具有下式的化合物:(肽-接头)n-B-疏水部分,其中每个肽独立地为HRC肽或靶向肽,前提是至少一个肽为HRC肽,每个接头独立地为二价连接部分,B为包含半胱氨酸、X和可选的Y和/或可选的Z的多价部分,其中X、Y和Z为本文所定义,且n为选自1、2、3或更多的整数;并且其中变体包括至少5个突变,其中至少5个突变独立地在刺突蛋白S1亚基或S2亚基或其组合中。

[0158] 在实施方案中,化合物包括靶向肽和一种或多种HRC肽。在实施方案中,靶向肽为ACE2靶向肽或受体结合结构域肽。在实施方案中,疏水部分为胆固醇。

[0159] 在实施方案中,至少5个突变独立地在N末端结构域(NTD)、受体结合结构域(RBD)、融合肽(FP)结构域、七肽重复1(HR1)结构域或其组合中。在实施方案中,至少5个突变独立地选自图3中列出的突变。

[0160] 在实施方案中,至少5个突变独立地选自SARS-CoV-2α变体的至少5个突变;SARS-CoV-2β变体的至少5个突变;SARS-CoV-2δ变体的至少5个突变;或SARS-CoV-2o变体的至少5个突变。在实施方案中,至少5个突变独立地选自SARS-CoV-2α变体的至少5个突变。在实施方案中,至少5个突变独立地选自SARS-CoV-2β变体的至少5个突变。在实施方案中,至少5个突变独立地选自SARS-CoV-2δ变体的至少5个突变。

[0161] 在实施方案中,至少5个突变独立地选自SARS-CoV-2o变体的至少5个突变。

[0162] 在实施方案中,变体包括至少10个突变。在实施方案中,变体包括至少15个突变。在实施方案中,变体包括至少20个突变。

[0163] 在实施方案中,SARS-CoV-2变体包括选自B.1.1.7(α)、B.1.351(β)、P.1(γ)、B.1.617.2(δ)、B.1.429/B.1.427(ε)、B.1.617.1(κ)、B.1.525(η)、B.1.526(ι)、P.3(θ)、P.2(ζ)和B.1.1.529(o)的至少一个变体。

[0164] 在实施方案中,SARS-CoV-2变体包括选自A.1-A.6、B.3-B.7、B.9、B.10、B.13-B.16、B.2、B.1系、P.1、P.2、P.3和R.1的至少一个变体。

[0165] 在实施方案中,B.1系包括至少一个(包括但不限于B.1、B.1.1、B.1.1.7、含有E484K的B.1.1.7、B.1.2、B.1.5-B.1.72、B.1.9、B.1.13、B.1.22、B.1.26、B.1.37、B.1.3-B.1.66、B.1.177、B.1.243、B.1.313、B.1.351、B.1.427、B.1.429、B.1.525、B.1.526、B.1.526.1、B.1.526.2、B.1.617、B.1.617.1、B.1.617.2、B.1.617.3、B.1.619、B.1.620和B.1.621)。

[0166] 在实施方案中,施用使用鼻内喷雾器、吸入器或雾化器实现。

[0167] 在实施方案中,化合物与至少一种其他抗病毒活性剂或疗法联合施用。

[0168] 受试者(优选人)可以是诊断出感染且有症状的、症状前期的或无症状的或处于发展感染风险中的个体。例如,受试者可以是由于直接或间接暴露或可能暴露至病毒(如SARS-CoV-2或其突变体)而处于发展病毒呼吸道感染风险中,例如通过暴露至已感染个体或病毒污染的污染物。受试者可以是病毒呼吸道感染已被确认的社区的居民或访客,例如,受试者可以是已感染个体的家庭成员,或受试者可以在护理已感染个体的医疗机构中工作。在某些实施方案中,处于感染风险的受试者是无症状的,并且在开始治疗前病毒已测试为阴性。在具体示例中,受试者可以由于暴露至SARS-CoV-2病毒(例如,来自已感染个体的呼吸飞沫或气溶胶和/或接触污染的污染物)而处于发展COVID-19中的风险。在进一步的方面,受试者正在患有COVID-19,包括患有轻度、中度或重度COVID-19的受试者。

[0169] 在本发明方法的某些实施方案中,受试者患有其他疾病或状况,如慢性阻塞性肺病(COPD)或溃疡性结肠炎,其可因感染而加重。

[0170] 组合物优选在受试者出现症状前(例如,症状前期)或症状开始时向受试者施用。组合物可按各种给药方案施用。例如,组合物可施用一次或多次,并持续一天或多天的进程。在某些实施方案中,组合物每天施用一次或多次,持续1至10天。在某些实施方案中,组合物每天施用一次或多次,直至受试者无症状和/或病毒检测为阴性。

[0171] 组合物可使用常规方法和设备施用到鼻通道(见D.Marx等人,IntechOpen,DOI:10.5772/59468。从以下可得:https://www.intechopen.com/books/drug-discovery-and-development-from-molecules-to-medicine/intranasal-drug-administration-an-attractive-delivery-route-for-some-drugs)。例如,组合物可作为滴剂或气雾剂喷雾施

用到鼻通道,例如,使用气雾剂瓶或多剂量喷雾泵,这可以提供均匀的定量剂量。每剂量的体积可变化,但通常约为50至约150μL。所需体积将取决于所需活性剂的剂量和组合物中活性剂的浓度。

[0172] 在期望递送到肺系统或肺的情况下,气雾化低浓度活性剂溶液在延长时间(例如,过夜)内可能是有效的。

[0173] 联合疗法

[0174] 本文描述的化合物或组合物可与其他活性剂和疗法共施用。

[0175] 在实施方案中,其他活性剂包括但不限于抗SARS-CoV-2的抗体。合适的抗体在例如US2022/0017604、US2022/0017614、US2021/0403550、US2021/0395345、US2021/0403537、US2021/0388066、US2021/0388065、US2021/0347859或US2021/0309733中描述,这些通过引用并入本文。在实施方案中,抗体为单克隆抗体,如卡西瑞单抗(casirivimab)、伊德单抗(imdevimab)、巴马单抗(bamlanivimab)或艾塞单抗(etesevimab)。在实施方案中,抗体为单克隆抗体疗法,如卡西瑞单抗加伊德单抗、巴马单抗,或巴马单抗加艾塞单抗。

[0176] 本发明的活性剂和组合物还旨在与由病毒感染患者提供的一般护理一起使用,包括肠胃外液体(包括葡萄糖盐水和林格氏乳酸盐)和营养物、抗生素(包括甲硝唑和头孢菌素抗生素,如头孢曲松和头孢呋辛)和/或抗病毒预防药(antiviral prophylaxis)、退烧药(如对乙酰氨基酚)和止痛药、止吐药(如甲氧氯普胺)和/或止泻药、维生素和矿物质补充剂(包括维生素K和硫酸锌)、抗炎剂(如布洛芬)、止痛药以及用于患者群体中其他常见疾病的药物(如青蒿素甲醚、青蒿琥酯-苯芴醇联合疗法、喹诺酮类抗生素如环丙沙星、大环内酯类抗生素如阿奇霉素、头孢菌素抗生素如头孢曲松、或氨基青霉素如氨苄西林)、或用于志贺菌病的药物。

[0177] 联合疗法可以同时或顺序方案施用。当顺序施用时,联合可以在两次或多次施用中被施用。

[0178] 本发明的化合物与一种或多种其他活性治疗剂的共施用通常指本发明的化合物和一种或多种其他活性治疗剂的同时或顺序施用,使得治疗有效量的本发明的化合物和一种或多种其他活性治疗剂都存在于患者体内。

[0179] 共施用包括在施用单位剂量的一种或多种其他活性治疗剂之前或之后施用单位剂量的本发明的化合物,例如,在施用一种或多种其他活性治疗剂的几秒、几分钟或几小时内和/或作为同一治疗方案的部分施用本发明的化合物。例如,可先施用单位剂量的本发明的化合物,随后在几秒、几分钟或几天内施用单位剂量的一种或多种其他活性治疗剂。可选地,可先施用单位剂量的一种或多种其他治疗剂,随后在几秒、几分钟或几天内施用单位剂量的本发明的化合物。在一些情况中,可希望先施用单位剂量的本发明的化合物,随后在数小时(例如1-12小时)后施用单位剂量的一种或多种其他活性治疗剂。在其他情况中,可希望先施用单位剂量的一种或多种其他活性治疗剂,随后在数小时(例如1-12小时)后施用单位剂量的本发明的化合物。

[0180] 联合疗法可提供“协同作用”和“协同的”,即,当活性成分一起使用时实现的效果大于来自单独使用这些化合物的效果之和。

[0181] 如本文所用,除非另有说明,词“一种/一个(a/an)”意指包括一个(种)或多个(种)。例如,术语“一个(种)试剂”包括单个(种)试剂和两个(种)或更多个(种)试剂的组合。

[0182] 如本文所用,术语“治疗(treating/treatment)”涵盖对哺乳动物中感兴趣的疾病或病况(例如,呼吸道感染)的治疗,优选为患有感兴趣的疾病或病况的人,且包括例如:预防或延迟哺乳动物中发生的疾病或病况的开始,特别是当该哺乳动物处于发展疾病风险中但尚未有症状和/或已诊断为患有该疾病;抑制疾病或病况,即,阻止其发展;缓解疾病或病况,即,引起疾病或病况的消退;和/或稳定疾病或病况。治疗包括改善或减轻疾病或病况的症状的严重程度,和/或抑制这些症状的进一步进展或恶化。治疗还包括与疾病的预期或历史的时间进程和/或严重程度相比,缩短疾病或病况的时间进程和/或严重程度。

[0183] 如本文所用,术语“预防”意指引起疾病或病况的临床症状不发展,且包括抑制可暴露或易感于病毒感染但尚未经历或显示感染症状的受试者中病毒感染的开始。

[0184] 本文描述的化合物或组合物的“有效量”或“治疗有效量”指足以实现特定效果或结果和/或预防或治疗疾病或病况和/或其症状的化合物的量,例如,全部或部分缓解与紊乱或病况相关症状,或停止或减缓这些症状的进一步进展或恶化,或预防紊乱或病况或为疾病或状况提供预防。“有效量”和“治疗有效量”具体包括本发明的化合物(单独或与另一活性剂联合)或本文描述的组合物的抗病毒量。

[0185] 尽管已参考本发明的优选实施方案特别示出和描述了本发明,但本领域技术人员将理解,在不脱离所附权利要求包含的本发明的范围的情况下,可在其中做出形式和细节的各种变化。

[0186] 本文提到的专利和科学文献建立了本领域技术人员可获得的知识。本文引用的所有美国专利和已公布或未公布的美国专利申请通过引用并入本文。本文引用的所有已公布的外国专利和专利申请通过引用并入本文。本文引用的所有其他已公布的参考文献、文件、手稿和科学文献通过引用在此并入。本文引用的所有专利、已公布的申请和参考文献的相关教导通过引用以其全部并入。

[0187] 实施例1

[0188] 使用优化的SARS-CoV-2假病毒中和试验(pseudotyped virus neutralization assay)(PNA)测试化合物。该假病毒中和试验被用于量化中和抗体的滴度或SARS-CoV-2分子的半数最大抑制浓度(IC50)(图2)。假病毒粒子使用去除糖蛋白G的基因修饰的水疱性口炎病毒(VSVΔG)制备。将VSVΔG病毒转导在先前转染有不同SARS-CoV-2冠状病毒株(WT(武汉)、α(B.1.1.7,英国)、β(B.1.351,南非)或γ(P.1,巴西)株)的刺突糖蛋白(去除了细胞质尾区(cytoplasmic tail)的最后19个氨基酸(ΔCT))的HEK293T细胞中。生成的假颗粒(VSVΔG-SpikeΔCT)含有可以相对发光单位(RLU)量化的荧光素酶报告基因。

[0189] 使用单轮感染试验在293T/ACE2靶细胞中测量了抗SARS-CoV-2假病毒的中和活性。在293T/17细胞(ATCC)中通过共转染编码密码子优化的SARS-CoV-2全长刺突(含有614位的G)的质粒、包装质粒pCMVΔR8.2和荧光素酶报告质粒pHR'CMV-Luc产生假病毒粒子。野生型和B.1.1.529(o)变体刺突、包装和荧光素酶质粒由Barney Graham博士(NIH,疫苗研究中心)友好提供。B.1.351(β)和B.1.617.2(δ)变体刺突质粒由Bing Chen博士(儿童医院,Boston MA)提供。稳定过表达人ACE2细胞表面受体蛋白的293T细胞系由Michael Farzan博士和Huihui Ma博士(斯克里普斯研究所)友好提供。对于中和试验,肽的系列稀释一式两份进行,接着加入假病毒。从康复的COVID-19患者汇集的血清样本或PBS/10% DMSO稀释缓冲剂分别用作阳性和阴性对照。板在37℃孵育1小时接着加入293/ACE2靶细胞($1x10^4$/孔)。包

含细胞+假病毒(无样本)或单独细胞的孔分别作为阳性和阴性感染对照。使用Promega BrightGlo荧光素酶试剂在第3天收获试验,并使用Promega GloMax荧光计检测发光。滴度报告为抑制50％或80％病毒感染的肽的浓度(分别为IC_{50}和IC_{80}滴度)。所有中和实验重复两次,具有类似结果。

[0190] 假病毒中和试验被用于评估本发明化合物针对四种SARS-CoV-2菌株(WT、α、β和γ)的抑制能力。化合物以5μM的起始浓度测试,并按照三种不同的系列稀释方案在96孔板进行系列稀释:10倍、5倍和3倍稀释。由于化合物首先在DMSO中重悬浮,因此3倍系列稀释的DMSO溶液(起始浓度0.052％的DMSO)也被在PNA中使用相同菌株进行测试,以解决化合物的稀释液对试验的影响。将每种假病毒的预定量(对应于约1,200,000RLU/孔)施用于板上,并与稀释的化合物孵育以允许化合物与假病毒结合。用于试验的阳性对照也被包括在每个板上,并用刺突假病毒的所有四种菌株测试。该对照由含有常规用于PNA测试的SARS-CoV-2刺突蛋白的中和抗体的人血清组成。

[0191] 在化合物/血清-假病毒复合物孵育后,从Vero E6细胞的96孔板中移除培养基,并将化合物-假病毒复合物转移到细胞上。测试板在37℃、5％CO_2下孵育过夜。孵育后,将荧光素酶底物添加至VeroE6细胞,并使用检测发光的读板仪读取板。发出的光的强度与化合物的中和效力水平成反比。然后使用标准的4参数逻辑模型对武汉和刺突变体的所有测试稀释液计算化合物IC50。10倍系列稀释计算的半数最大抑制浓度(IC50)和相应的R平方值如表1所示。EK1阳性对照针对WT、o、δ和β的IC50分别为0.622μM、0.241μM、0.244μM和0.527μM(数据未示出)。

[0192] 表1

[0193]

病毒株	刺突突变	IC50	R^2
实施例 1			
WT (武汉)		0.046 μM	0.986
α	8	0.057 μM	0.987
β	9	0.051 μM	0.905
γ	10	0.060 μM	0.985
实施例 2			
野生型 (G614)		0.026 μM	
o	30	0.014 μM	
β	9	0.009 μM	
δ	10	0.009 μM	

[0194]

[0195]

术语/缩写	定义
%	百分数
BRA	巴西
CC	细胞对照
CoV	冠状病毒
CT	胞质尾区
CV	变异系数
DMSO	二甲基亚砜
G	糖蛋白 G
GMC	几何浓度（Geometric Concentration）
GxP	良好的实践惯例(Good x Practices)
HEK	人类胚胎肾
ID	身份
IC50	半数最大抑制浓度
Log	对数
PC	假颗粒对照
PNA	假型病毒中和试验
RBD	受体结合结构域
RLU	相对发光单位
SA	南非
SARS-CoV-2	严重急性呼吸综合征冠状病毒 2

[0196]

术语/缩写	定义
SD	标准偏差
SMP	SoftMax Pro
Sple	样本
SQRT	平方根
STD	标准
TO	任务顺序（Task Order ）
UK	英国
VSV	水疱性口炎病毒（Vesicular Stomatitis Virus）

[0197] 实施例2-仓鼠中针对SARS-CoV-2的潜在抗病毒疗法的功效

[0198] 本研究的目的是在仓鼠模型中测试DCOY101作为针对SARS-CoV-2(COVID-19的病

原体)的潜在抗病毒疗法的体内功效。测试材料(TA),即DCOY101、溶液和剂量在表3中限定。本体测试材料(bulk test materials)在约-20±5℃下储存并避光,直至使用。测试物品的给药制剂在开始给药时制备,并等分和储存在-20±5℃。

[0199]

表 3. 测试物品制备

溶液编号	TA 的 ID	剂量 (mg/kg)	TA 制备溶液 mg/ml	媒介物
1	媒介物	0	0	在 1x PBS 中的 20% PEG300*
2	DCOY101 – 10	10	20	
3	DCOY101 – 5	5	10	
4	DCOY101 – 2.5	2.5	5	
5	DCOY101 – 1	1	2	

[0200] 根据实验设计(图7)和表2的详细信息,仓鼠每天一次(Q.d.)鼻内施用媒介物或测试材料给药制剂,持续9天(从研究第-2天到第6天)。根据以下实验设计(图7)和表2的详细信息,在研究第0天,仓鼠鼻内给药靶向SARS-CoV-2的B.1.617.2的5x $10^4$$TCID_{50}$/只动物并在4±2小时后用TA处理。

[0201]

表 2. 实验设计

[0202]

ID	N	治疗	给药方案 Qd	途径	口腔拭子	中间处死 (n=4)	终末处死 (n=4)
G1	8	媒介物对照	第-2 至第 6 天	IN	d1-d7	d2	d7
G2	8	DCOY101 – 10	第-2 至第 6 天	IN	d1-d7	d2	d7
G3	8	DCOY101 – 5	第-2 至第 6 天	IN	d1-d7	d2	d7
G4	8	DCOY101 – 2.5	第-2 至第 6 天	IN	d1-d7	d2	d7
G5	8	DCOY101 – 1	第-2 至第 6 天	IN	d1-d7	d2	d7
总计	40+4*						

[0203] 实验终点由垂死/死亡观察、体重和体重变化、临床症状确定、肉眼尸检、通过RT-qPCR的脱落在口腔拭子上的病毒、通过$TCID_{50}$病毒滴度的肺组织和鼻甲中的病毒负载以及通过RT-qPCR的肺中的病毒基因组拷贝数和肺组织病理分析组成。

[0204] 无SARS-CoV-2疾病相关的死亡。然而,对照组中的两只动物在给药过程中意外死亡。

[0205] 设计为媒介物的对照组1中的动物出现平均体重损失-10.5%,而在研究进程中所有治疗组为最大-1.1%(组3)或甚至体重增加+3.4%(组2)。图8.特别在第-2天,任何组之间显示无差异。在第-1天,与媒介物对照组1相比具有更高剂量10mg/kg的组2出现显著的(P≤0.0187,*)体重损失(图9)。在第0天,与媒介物对照组1相比,第二更高剂量DCOY 5mg/kg的组3出现显著的(P≤0.0315,*)体重损失(图9)。在第1天,TA在更高剂量施用的任何组中未观察到显著差异。从第2天到第4天,在此期间中更低剂量G4-DCOY-2.5mg/kg组和G5-DCOY-1mg/kg组一致显示轻微差异(*)。在研究第5天到第7天,在非传统药物响应浓度中观察到强显著差异。当与媒介物对照组1(平均体重变化为-10.5%)相比,组2更高剂量DCOY 10mg/kg(平均体重变化为+3.4%)和更低剂量组DCOY 1mg/kg(平均体重变化为+0.9%)具有最大体重增加(***,**)(图9)。

[0206] 从第1天到第7天,脱落在口腔拭子中的病毒被估算为通过RT-qPCR分析的病毒基因组拷贝数。脱落特征概要在图10中示出。在第1天、第4天、第5天、第6天或第7天的任何组中没有统计差异。但在第2天和第3天有显著减少。在第2天,当与对照组1相比,组2显示***P≤0.001,组3显示****P≤0.0001,组4显示***P≤0.001和组5显示****P≤0.0001。在第3天,组3、组4和组5的减少不显著,但组2仍然为***P≤0.001(图11)。

[0207] 来自肺样本的RT-qPCR滴度显示在每个组内的结果大体一致,并遵循与体重变化负相关。使用来自剩下的肺组织样本和口腔拭子的分离RNA执行一步RT-qPCR来估算病毒拷贝数。简而言之,使用Quick-RNA病毒试剂盒(Zymo Research)从储存在RNA/DNA保护剂(Shield)中的肺组织样本或口腔拭子上清液中提取RNA。按照制造商的方案,以分离RNA作为模板使用BlazeTaq探针一步RT-qPCR试剂盒(GeneCopoeia;Rockville,MD)进行RT-qPCR分析。使用以下RT-qPCR循环条件:50℃进行15分钟(RT),95℃进行2分钟(变性),然后40个循环的95℃10秒接着62℃ 45秒(延伸)。如下引物和探针用于SARS-CoV-2检测:

[0208]

表 4. qPCR 引物

引物:	*引物序列*
2019-nCoV_N1-F:	5'-GACCCCAAAATCAGCGAAAT-3'
2019-nCoV_N1-R:	5'-TCTGGTTACTGCCAGTTGAATCTG -3'
探针:	
2019-nCoV_N1-P:	5'-FAM-ACCCCGCATTACGTTTGGTGGACC-BHQ1-3'

[0209] 为了估算病毒拷贝数,将样本与合成RNA的标准曲线比较。在第2天比第7天有更多的病毒载量变化。然而,如图12所示,在第2天和第7天,与媒介物对照组1相比,组2、组3、组4和组5在收集的肺组织中存在显著差异的减少(ns P>0.05,*P≤0.05,**P≤0.01,***P≤0.001)。

[0210] 在第2天和第7天,通过$TCID_{50}$试验估算肺中的病毒载量。与对照组1(媒介物对照)相比时,在第2天组2、组3、组4和组5(**P≤0.01)中的动物显示肺中的病毒载量累积显著减少,但无明显剂量响应。这些结果与RT-qPCR读数一致(图13)。在第7天,通过$TCID_{50}$试验在组1、组2、组3、组4或组5的任意中不再检测到传染性病毒;然而,RT-qPCR仍然检测到剩余的病毒基因组,但数量较少。

[0211] 通过$TCID_{50}$评估上呼吸道中病毒负载鼻甲。此分析结果显示,媒介物对照组1在第2天相比于组2、组3、组4或组5具有更高的滴度,但这种差异无统计学意义。在第7天,通过$TCID_{50}$试验在组1、组2、组3、组4或组5的任意中未检测到传染性病毒(图14)。

[0212] 基于体重损失的减少与用独立于使用剂量的DC101治疗的动物的肺中的病毒载量显著减少一致,此研究数据表明,DCOY101在测试条件下在仓鼠模型中对疾病高发期中减少的SARS-CoV-2相关表型和减少的肺中的病毒滴度以及减少的脱落病毒载量具有功效。

[0213] 实施例3-金黄仓鼠(Syrian Hamster)模型中抗SARS-CoV-2的DCOY101的暴露前预防(PrEP)和暴露后预防(PeP)功效

[0214] 此研究的目的是当在仓鼠模型中针对SARS-CoV-2(COVID-19的病原体)感染前或感染后在不同时间启动治疗时测试DCOY101的功效。测试材料(TA),即DCOY101、溶液和给药在表6中限定。本体测试材料由赞助商提供并在约-20±5℃保存且避光,直至使用。测试物品的给药制剂在开始给药时制备,并等分和储存在-20±5℃。

[0215]

表 6. 测试物品制备

溶液编号	TA 的 ID	剂量 (mg/kg)	TA 制备溶液 mg/ml	媒介物
1	媒介物	0	0	在 1x PBS 的 20% PEG300*
2	DCOY101	5	10	

[0216] 根据实验设计(图15)和表5的详细信息,仓鼠每天一次(Q.d.)鼻内施用媒介物或测试材料给药制剂,持续9天。根据以下实验设计(图15)和表5的详细信息,在研究第0天,仓鼠鼻内给药靶向SARS-CoV-2的B.1.617.2的5x 10^4TCID_{50}/只动物并在4±2小时后用TA处理。

[0217]

表 5. 实验设计

组别	N	治疗	给药方案 (QD) 开始	途径	口腔拭子	中间处死第 2 天 (n=6)	终末处死第 7 天 (n=6)	动物数量
1	12	媒介物对照	-48 hr 至 d6	IN	d1-d7	动物# 7-12	动物# 1-6	1-12
2	12	PrEP DCOY101	- 48 hr 至 d6	IN	d1-d7	动物# 19-24	动物# 13-18	13-24
3	12	PEP+2 DCOY101	+2 hr 至 d6	IN	d1-d7	动物# 31-36	动物# 25-30	25-36
4	12	PEP+12 DCOY101	+12 hr 至 d6	IN	d1-d7	动物# 43-48	动物# 37-42	37-48
5	12	PEP+24 DCOY101	+24 hr 至 d6	IN	d1-d7	动物 # 55-60	动物# 49-54	49-60
6	12	PEP+36 DCOY101	+ 36 hr 至 d6	IN	d1-d7	动物# 67-72	动物# 61-66	61-72

总计= 72 + 7* = 79

*10% (n=7)更多的动物将被订购用于随机过程。

[0218] 实验终点由垂死/死亡观察、体重和体重变化、临床症状确定、肉眼尸检、通过RT-qPCR的脱落在口腔拭子上的病毒、通过$TCID_{50}$病毒滴度的肺组织中的病毒负载以及通过RT-qPCR在肺中的病毒基因组拷贝数和肺组织病理分析。

[0219] 无SARS-CoV-2疾病相关的死亡。

[0220] 设计为媒介物的对照组1中的动物出现平均体重损失-10.84％,而所有治疗组具有在组6中看到的最大-1.39％ BWL。组2(+3.31％)、组3(+2.09％)和组4(+1.02％)都在研究进程中体重增加(图16)。第-2天和第-1天显示任意组之间无差异。在第1天,与媒介物对照组1相比,组2(P≤0.0272,*)、组3(P≤0.0038,**)、组4(P≤0.0076,**)和组6(P≤0.0015,**)都显示显著的体重损失(图17)。从第2天到第4天,组2(用5mg/kg的DCOY101作为鼻内预防性抗病毒从挑战之前48小时开始至第6天给药)显示一致的显著差异(P≤0.0029,**;P≤0.0003,***;P<0.0001****)。在研究第5天到第7天期间,在暴露后组(组3至组6)中观察到与经典时间响应曲线一致的强显著差异。简而言之,组2(处理前-48小时)具有平均体重变化+3.31％,而组6(处理后+36小时)具有平均体重变化-1.39％。

[0221] 从第1天到第6天,口腔拭子中的病毒脱落被估算为由RT-qPCR分析的病毒基因组拷贝数。由于缺少可信度,第7天的数据被排除在分析之外。脱落特征概要在图18中示出。尽管相对于对照组1有一些数值差异,尤其在第3天,但除了第5天,在第1、2、3、4或6天的任何组中未发现统计学差异,其中当与对照组1相比时,组4(暴露前+36小时)显示(**P≤0.0030)显著增加。每天关于通过RT-qPCR的口腔拭子的详细信息在图19中示出。

[0222] 简而言之,来自肺部样本的RT-qPCR(使用上述表4中的引物)滴度显示一些数值差异,特别是在暴露前治疗(PrEP)中,但又无显著差异。然而,如图20中显示,在第7天,与媒介物对照组1相比,组2(PrEP)、组3(PEP+2)和组5(PEP+24)在收集的肺组织中显示显著差异的减少(P≤0.0028,**;P≤0.0017,**;P≤0.0019,**)。

[0223] 在第2天和第7天,通过$TCID_{50}$试验估算肺中的病毒载量。在第2天存在一些数值差异,组2(PrEP)的大多数动物(n＝5/6)显示在检测限滴度以下(below detection limit titer),但一只动物具有远离其他值的异常距离,造成与组1(媒介物对照组)相比时肺中病毒载量累积的总体无显著减少(图21)。在组4、组5和组6中观察到相同现象,6只动物中有2只出现较低的滴度,与抗病毒功效一致,但不是所有动物遵循相同的一致性。这些结果与RT-qPCR读数一致。在第7天,通过$TCID_{50}$试验在任何组中未检测到感染性病毒粒子,图21;然而,通过RT-qPCR仍然检测到较低量的剩余RNA病毒基因组或片段,图20。

[0224] 基于体重损失的显著减少,该研究中的数据表明,暴露前或暴露后直至挑战后36小时,每天一次对仓鼠鼻内施用50μl的5mg/kg的DCOY101持续6天,赋予针对SARS-CoV-2的B.1.617.2变体的部分保护,如当与媒介物对照组G7相比,在第2天通过$TCID_{50}$的在肺中的病毒负载减少和第7天肺中的病毒基因组拷贝数减少以及在第3天口腔拭子中更低的病毒拷贝数的更低程度所示的。

[0225] 在测试条件下,DCOY101似乎减少了SARS-CoV-2疾病的发病原,但似乎对仓鼠模型肺中的病毒载量没有影响或未减少病毒脱落。

[0226] 实施例4-潜在抗病毒化合物针对β冠状病毒在体外的疗效

[0227] 此研究的目的是测试DCOY101作为针对β-CoV(SARS-CoV-1、MERS-CoV、WA1、δ和SARS-CoV-2的o变种)的潜在抗病毒治疗剂的体外功效。

[0228] 测试物品(TA)在表7中被确认。

[0229]

表 7: 测试物品确认

编号	TA 的 ID	分子量	溶解
1	DCOY101	10336.6 g/mol	DMSO
2	EK1	10983.6 g/mol	DMSO

[0230] 测试物品以冻干粉提供,并按照表8中的方案在DMSO中以10mg/ml(或967.49μM)的储备浓度(stock concentration)稀释,且稀释后将在1x培养基(含有2% FBS的1x DMEM)中。

[0231]

表 8: 测试物品稀释方案

编号	稀释	2x 初始 TA 浓度 (μM)	1x 初始 TA 浓度(μM)
1	纯的 (neat)	200	100
2	1:3	66.6	33.3
3	1:9	22.2	11.1
4	1:27	7.4	3.7
5	1:81	2.4	1.2
6	1:243	0.82	0.41
7	1:729	0.27	0.13
8	1:2187	0.09	0.04

[0232] 以0.005$TCID_{50}$/细胞的靶MOI研究剂量依赖的抗病毒作用。病毒在如表9列出的非洲绿猴肾(Vero E6)细胞、人上皮细胞(Calu-3)、人成纤维细胞(MRC-5)、恒河猕猴(Macaca mulatta monkey rhesus)肾细胞(LLC-MK2)或结直肠上皮腺癌人细胞(Caco-2)中培养和滴定。细胞在含有10％胎牛血清和抗生素的达尔伯克的最小基本培养基(Dulbecco's Minimum Essential Medium)中维持。对于功效试验,FBS减少至2％。

[0233]

表 9: 病毒

编号	ID.	菌株/分离株	BEI 编号	细胞系	TCID50 c.d.#	检测	BSL
1	WA1	hCoV-19/USA-WA1/2020 (系 A.1)	NR-52281	Vero E6	200	抗体	3
2	δ	USA/MD-HP05647/2021 (系 B.1.617.2)	NR-55672	Vero E6	200	抗体	3
3	o	hCoV-19/USA/MD-HP20874/2021 (系 B.1.1.529)	NR-56461	Calu-3	400	抗体	3
4	P1	hCoV-19/日本/TY7-503/2021 (P.1.)	NR-54982	Vero E6	200	抗体	3
5	SARS-CoV-1	SARS-1 菌株: Urbani 200300592	NR-18925	Vero E6	200	抗体	3 + BSAT
6	MERS-CoV	EMC/2012	NR-44260	Vero E6	200	抗体	3
7	OC43	OC43	NR-52725	VAT		抗体	2
8	229E	229E	NR-52726	MRC-5		抗体	2
9	NL63	NL3 或 Amsterdam 1	NR-470	LLC-MK2 或 Caco2		抗体	2

[0234] 使用前-后治疗方案测定每个测试物品的抗病毒活性。在被加入到单层融合性Vero E6细胞之前,TA与病毒混合并孵育60±10分钟,一式三份(in triplicate)。然后TA:病毒被加入到细胞单层以允许病毒吸附60-90分钟。吸附后,用1x PBS或培养基洗涤细胞,并在细胞上方更换含TA的1x培养基。瑞德西韦游离碱作为阳性对照化合物平行评估。含DMSO的细胞作为阴性对照平行评估。结果在图22-28示出。

[0235] 尽管已参考本发明的优选实施方案特别示出和描述了本发明,但本领域技术人员将理解,在不脱离所附权利要求包含的本发明的范围的情况下,可在其中做出形式和细节的各种变化。

[0236] 本文提到的专利和科学文献确立了本领域技术人员可获得的知识。本文引用的所

有美国专利和已公布或未公布的美国专利申请通过引用并入本文。本文引用的所有已公布的外国专利和专利申请通过引用并入本文。本文引用的所有其他已公布的参考文献、文件、手稿和科学文献通过引用在此并入。本文引用的所有专利、已公布的申请和参考文献的相关教导通过引用以其全部并入。

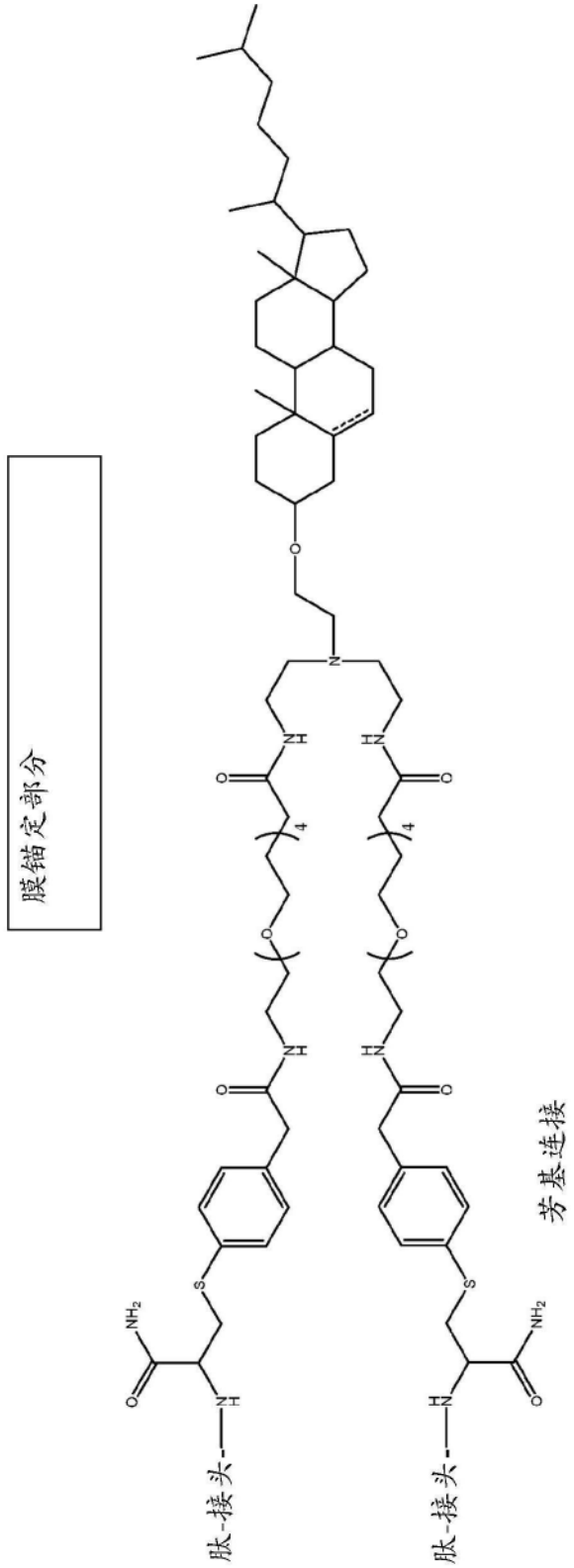


图1A

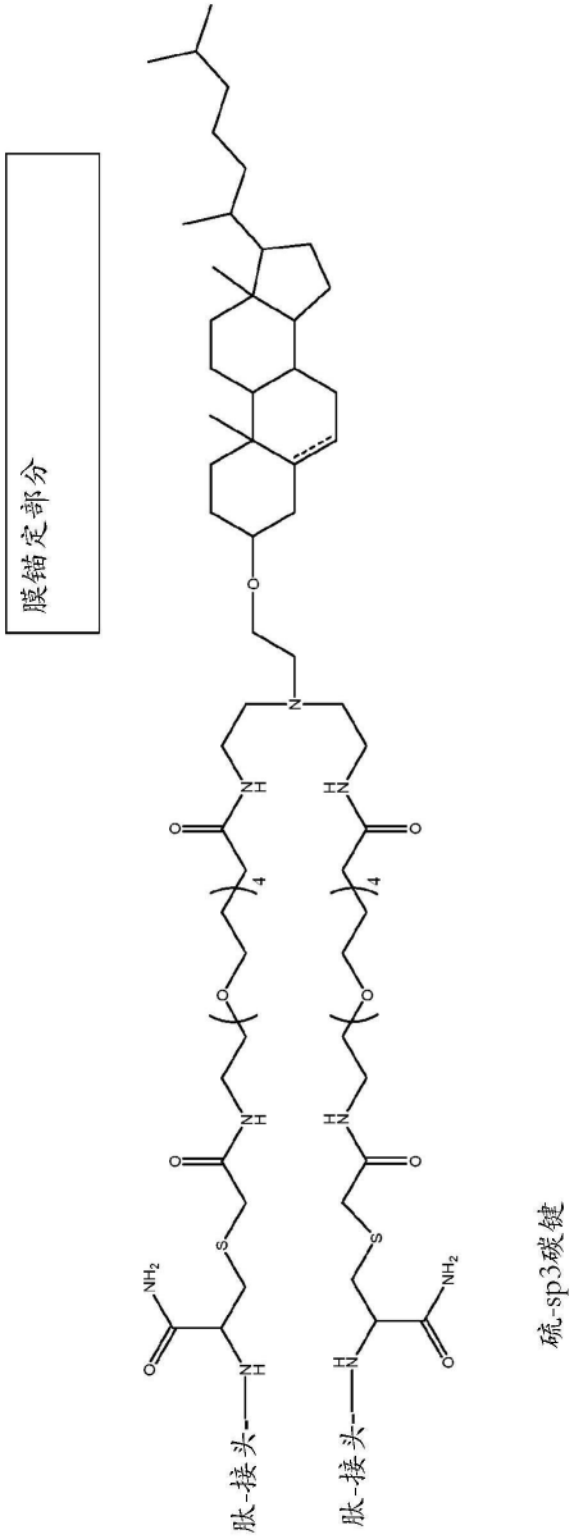


图1B

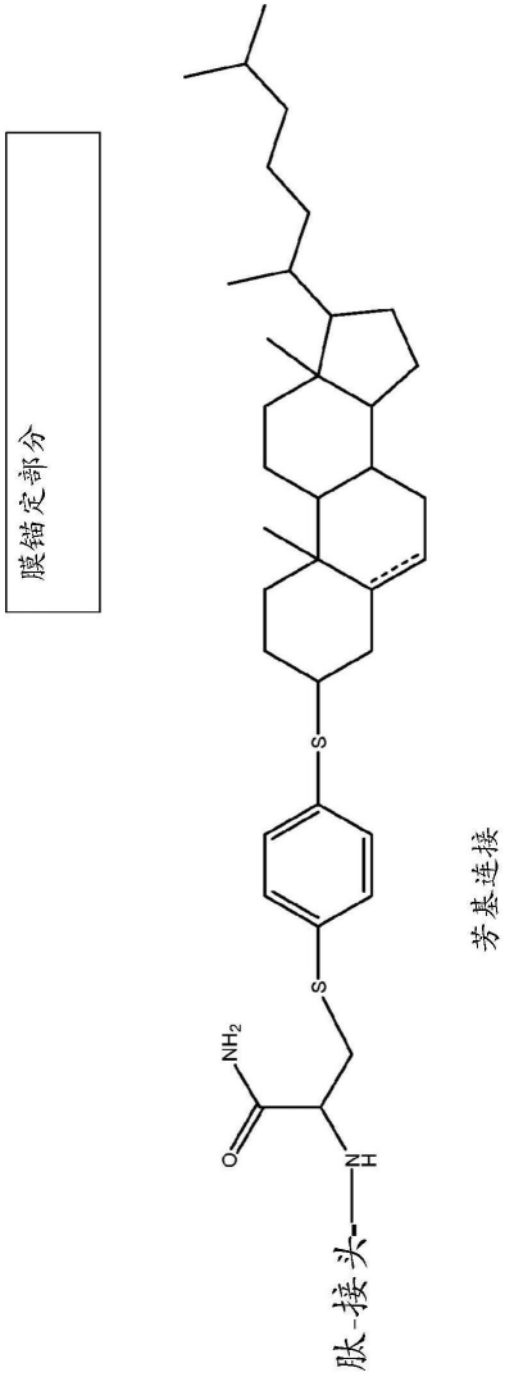


图1C

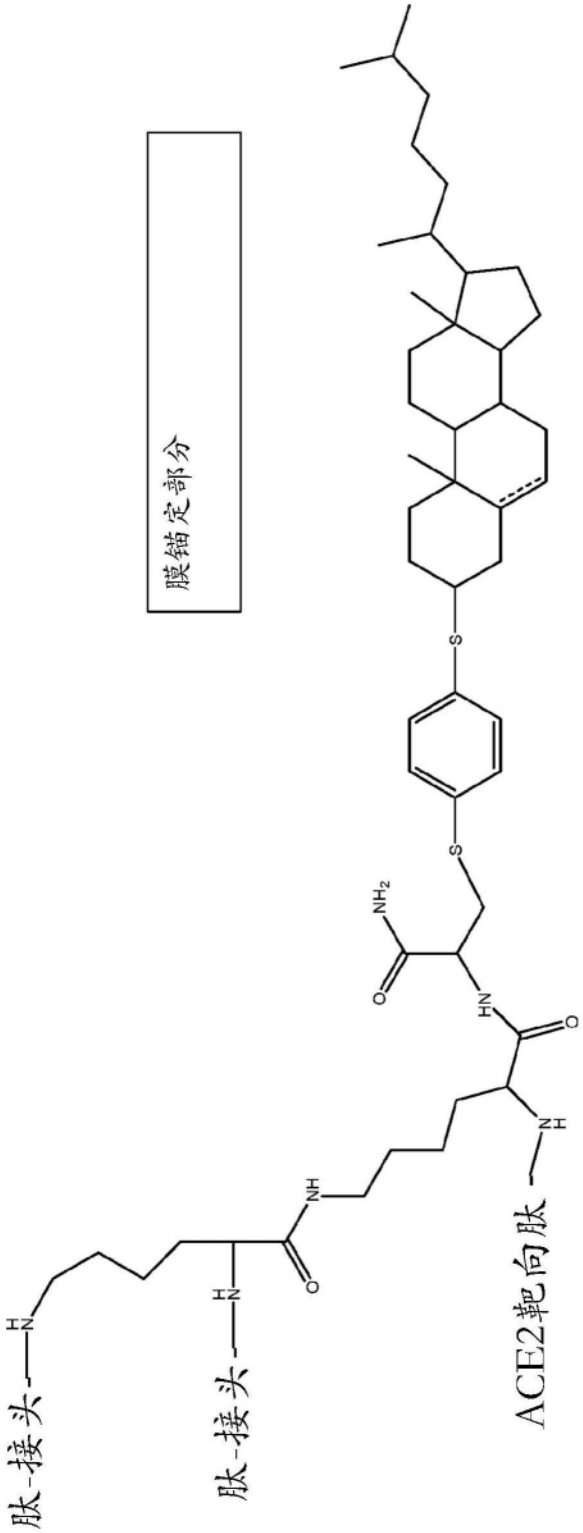


图1D

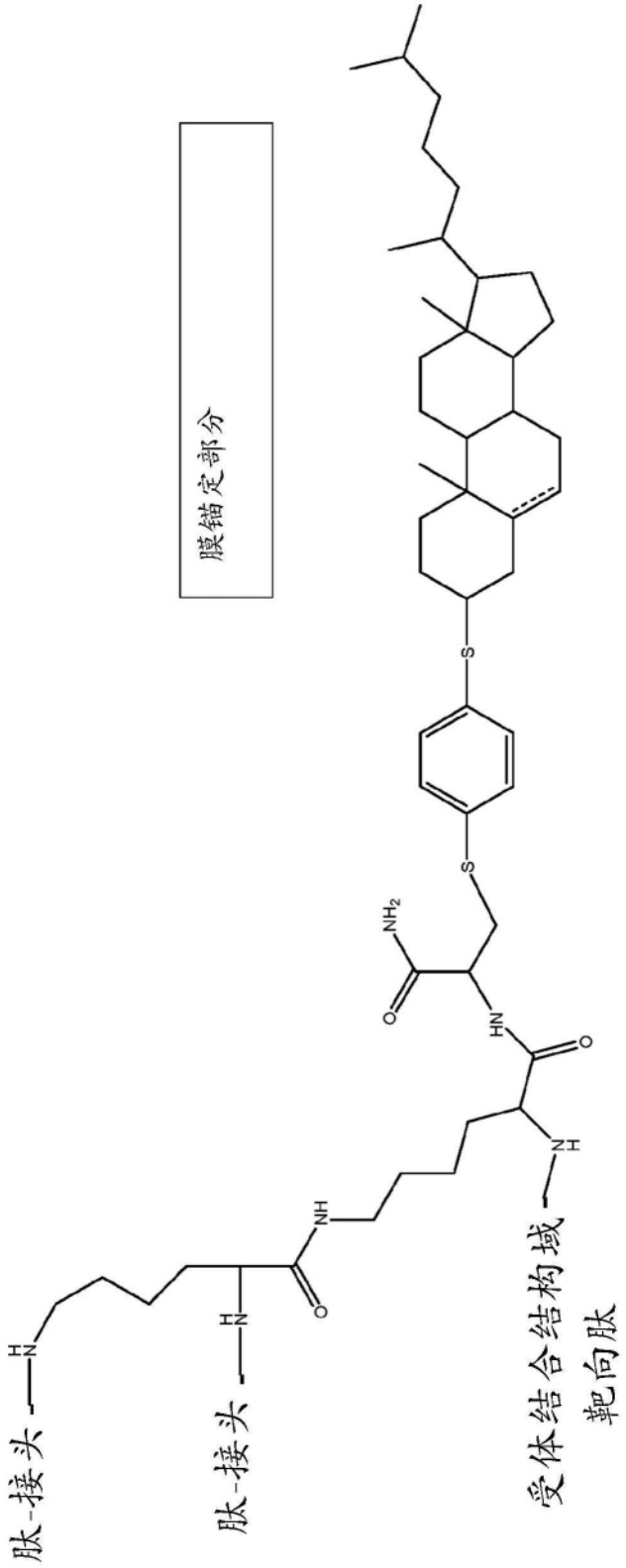
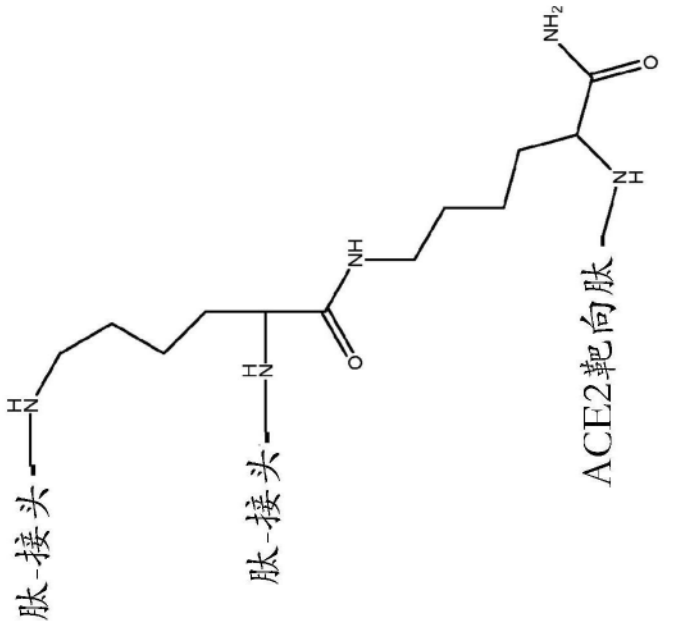


图1E



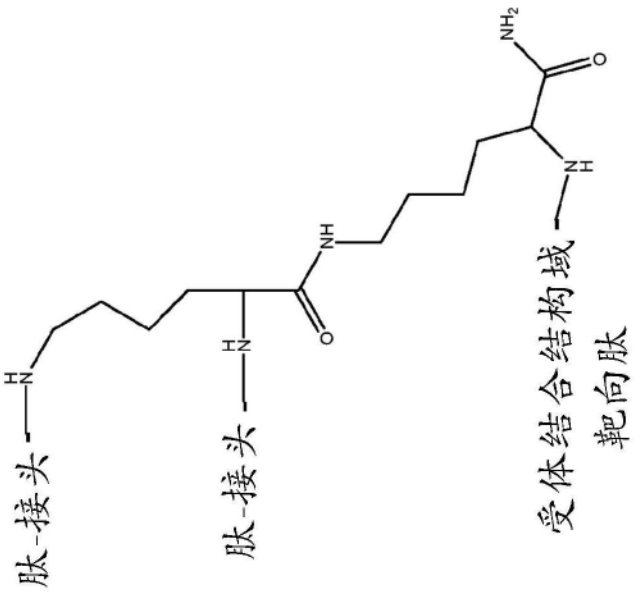


图1F

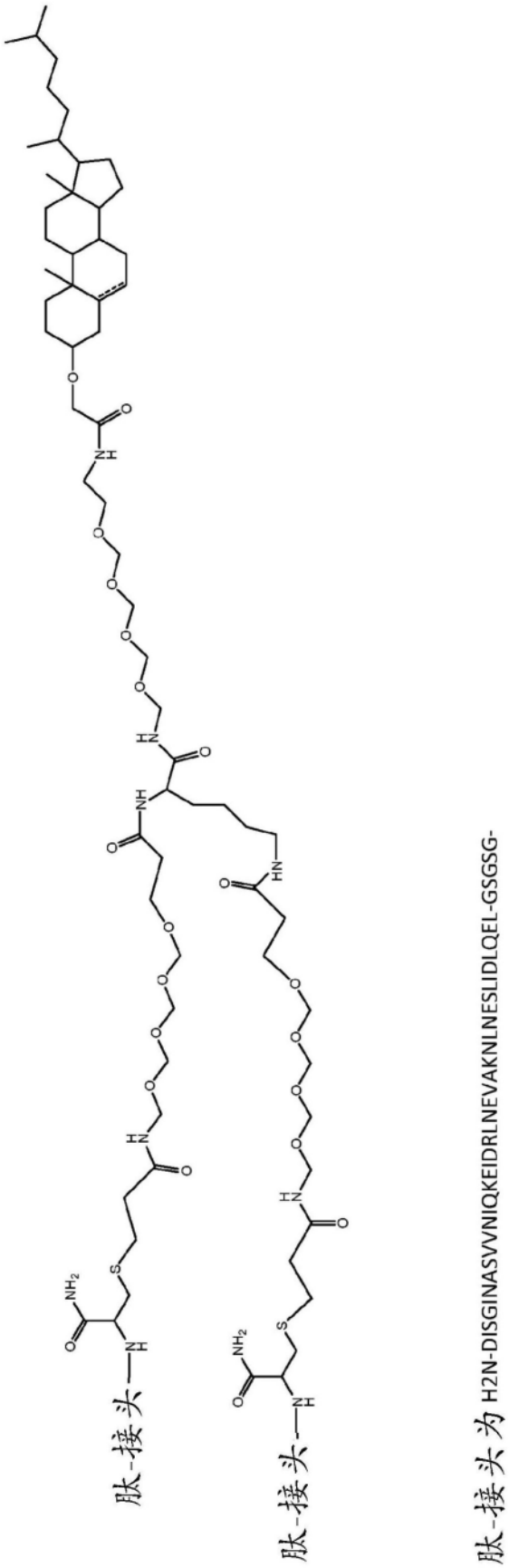

肽-接头—
肽-接头—
肽-接头为 H2N-DISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQEL-GSGSG-

图1G

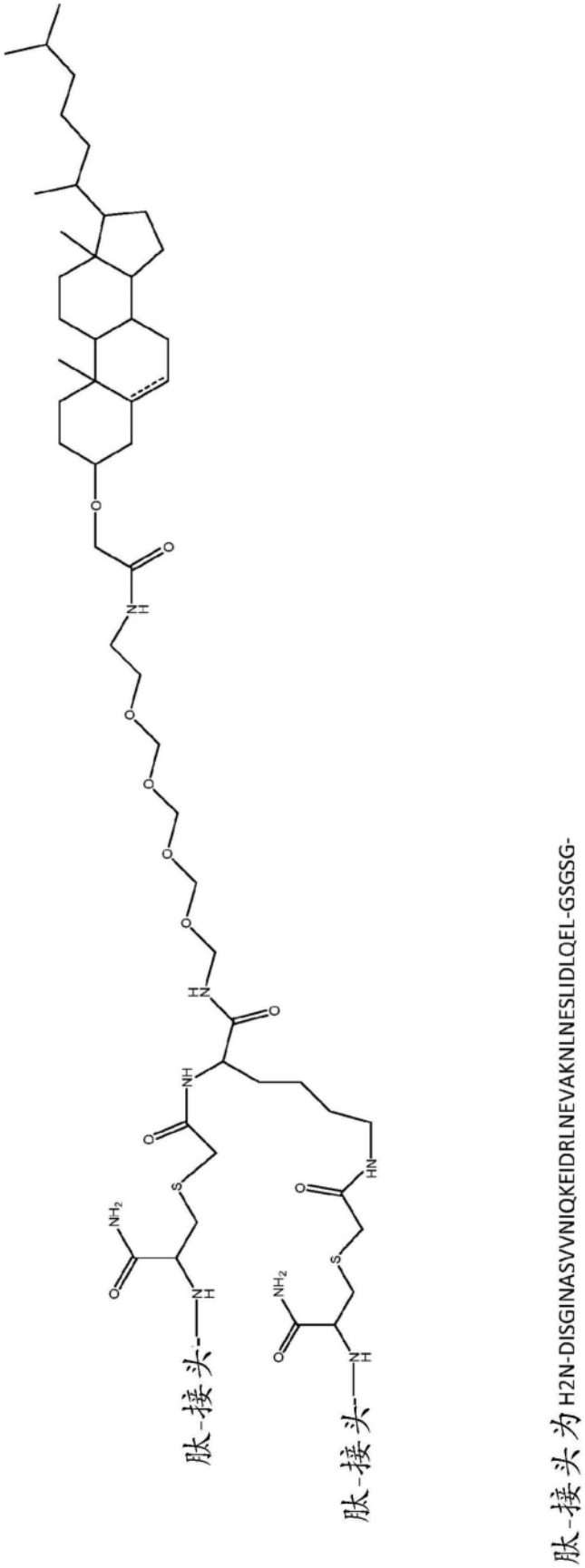

肽-接头
肽-接头
肽-接头为H2N-DISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQEL-GSGSG-

图1H

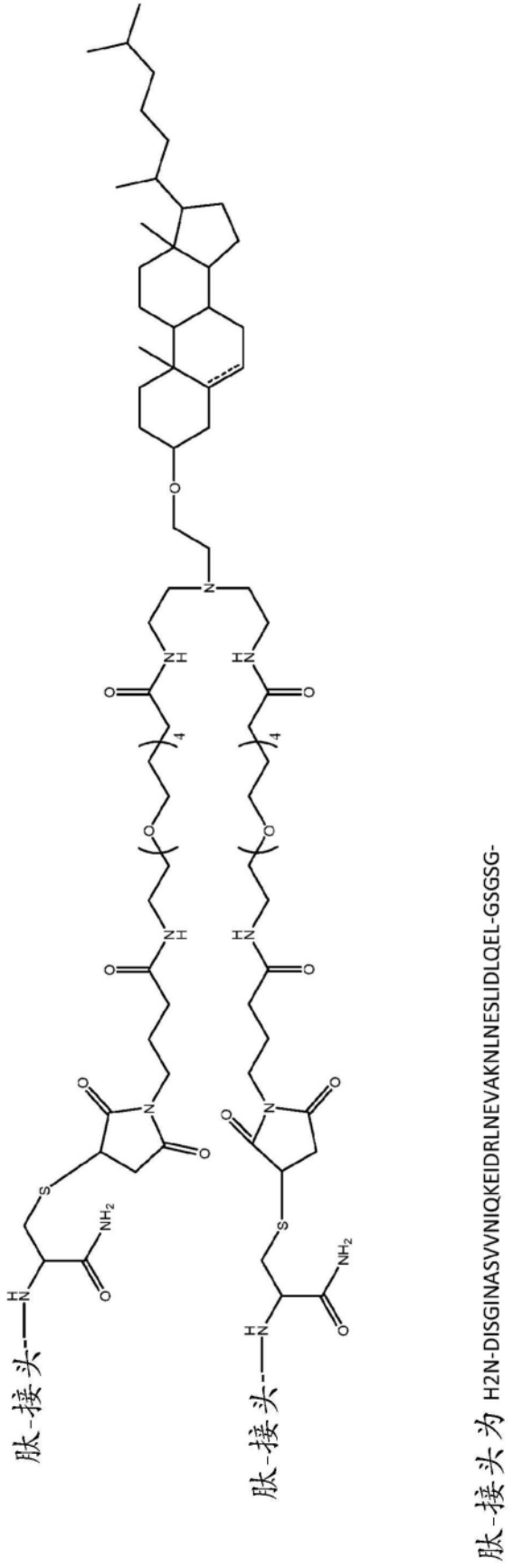

肽-接头
肽-接头
肽-接头为 H2N-DISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQEL-GSGSG-

图1I

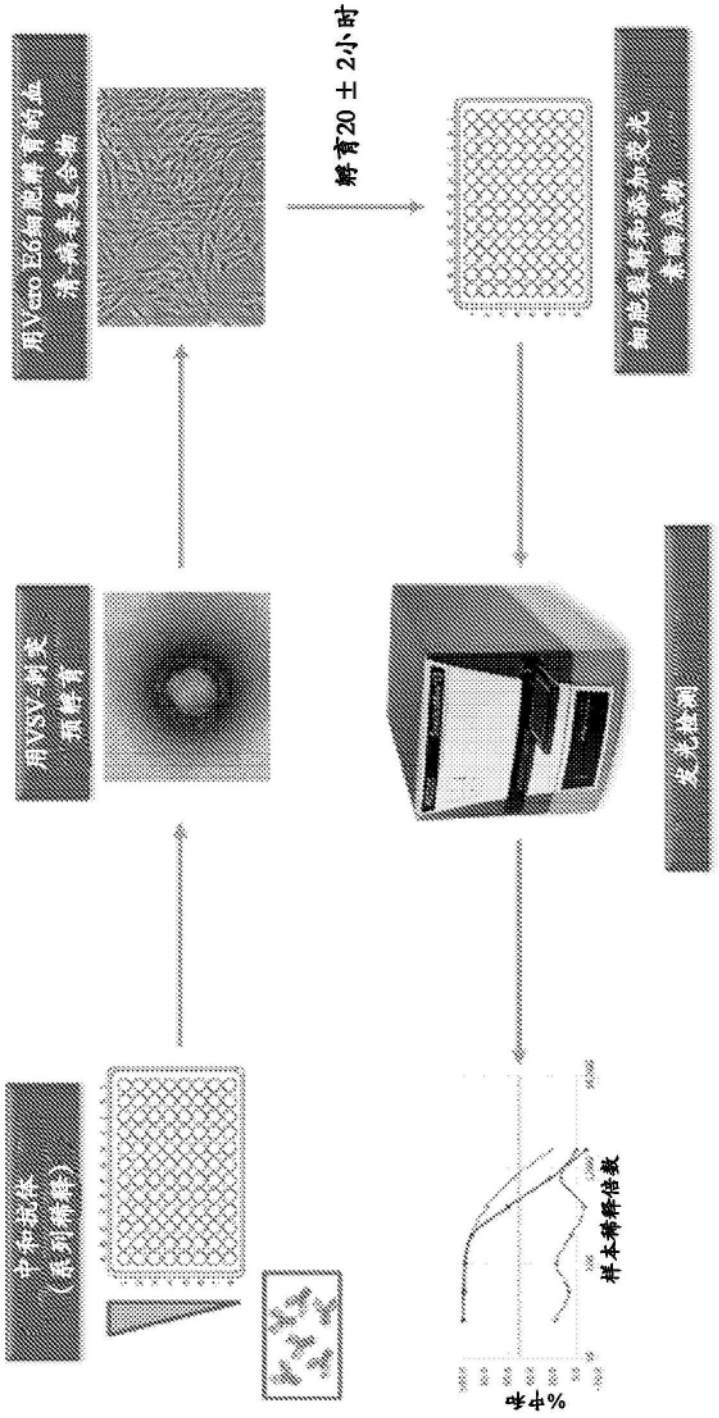

用Vero E6细胞孵育的血清-病毒复合物
孵育20 ± 2小时
细胞孵育和添加荧光素酶底物
用VSV-刺突假型孵育
荧光检测
中和抗体（系列稀释）
样本稀释倍数
中和%

图2

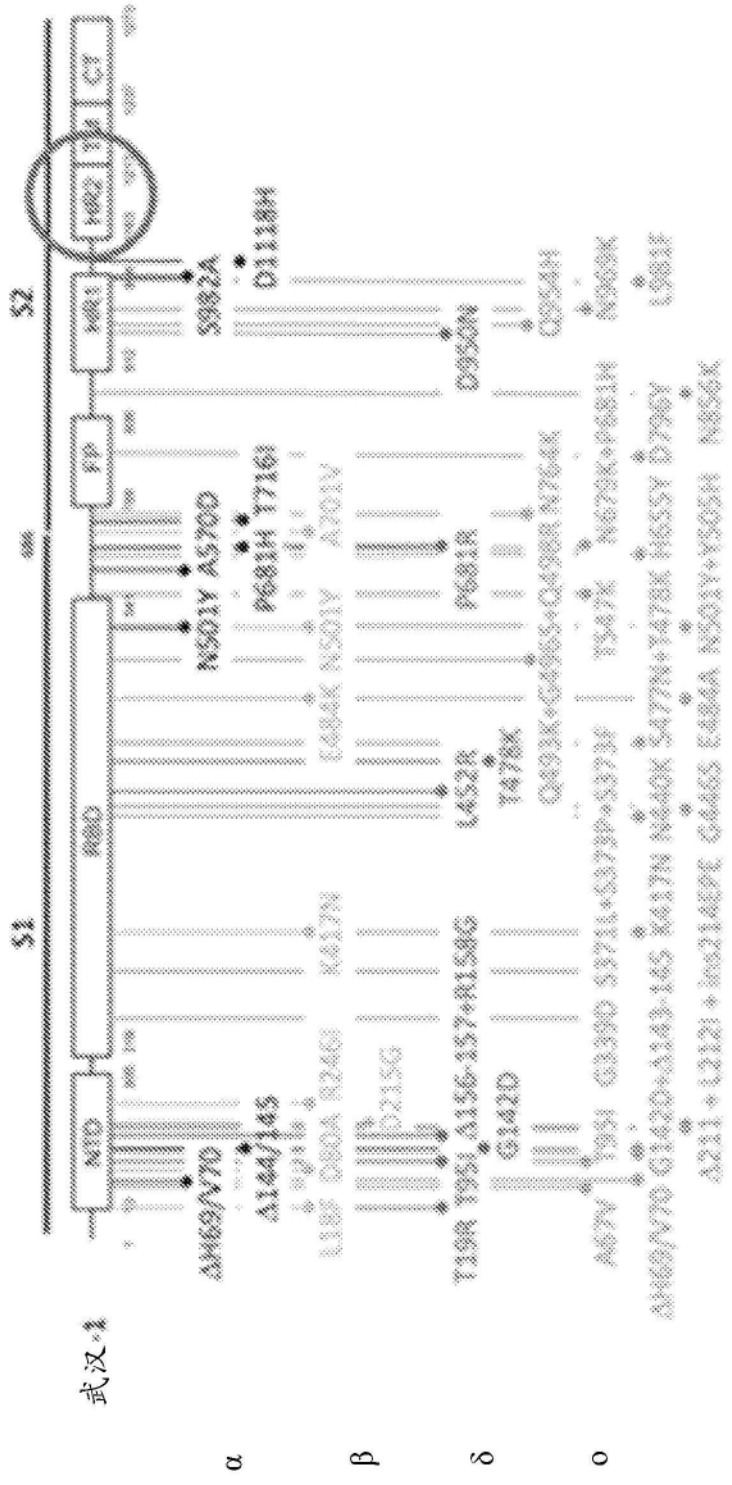


图3

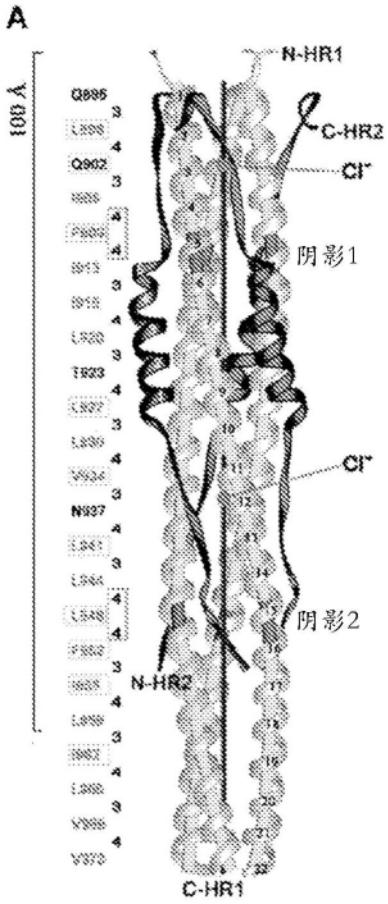


图4

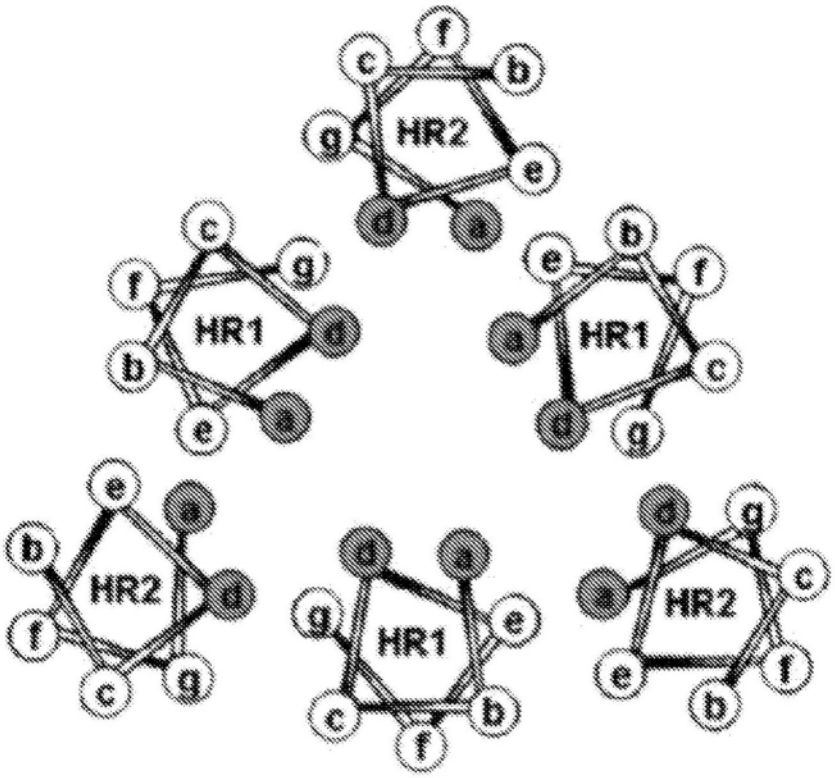


图5

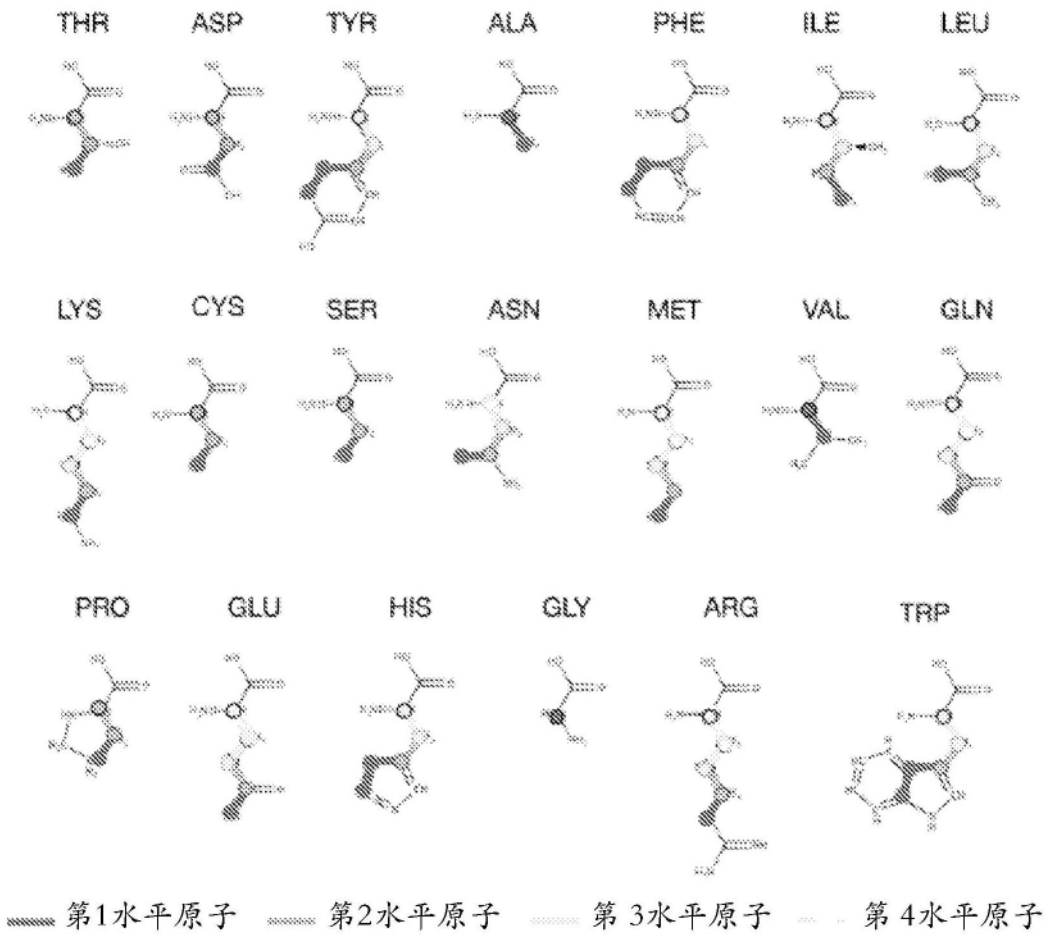

THR
ASP
TYR
ALA
PHE
ILE
LEU
LYS
CYS
SER
ASN
MET
VAL
GLN
PRO
GLU
HIS
GLY
ARG
TRP
第1水平原子
第2水平原子
第 3水平原子
第 4水平原子

图6

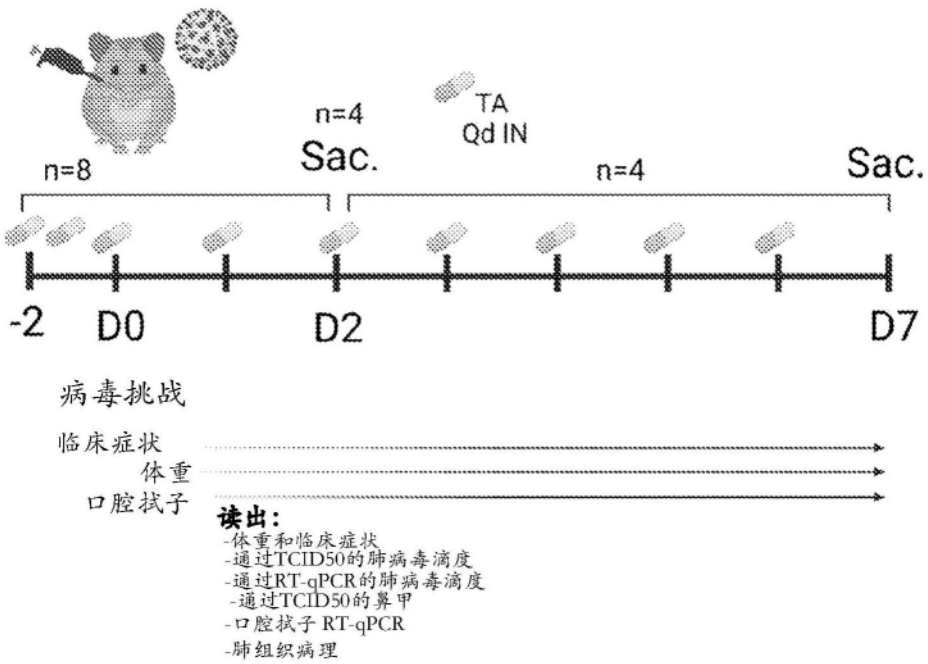

n=4
Sac.
TA
Qd IN
n=8
n=4
Sac.
-2
D0
D2
D7
病毒挑战
临床症状
体重
口腔拭子
读出:
-体重和临床症状
-通过TCID50的肺病毒滴度
-通过RT-qPCR的肺病毒滴度
-通过TCID50的鼻甲
-口腔拭子 RT-qPCR
-肺组织病理

图7

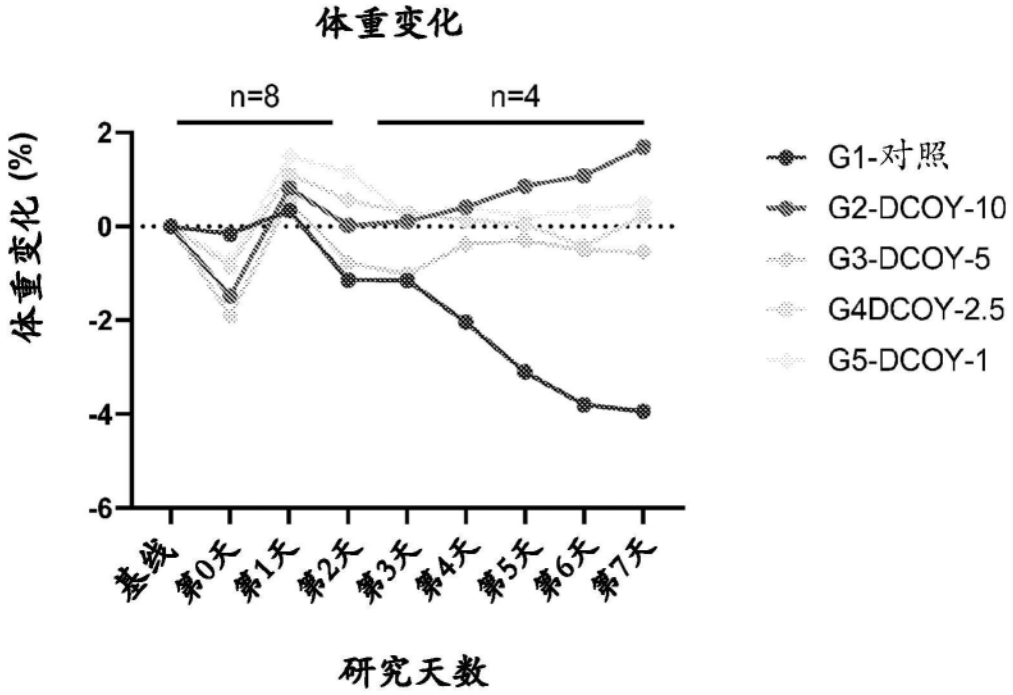

体重变化
n=8
n=4
体重变化 (%)
2
0
-2
-4
-6
基线
第0天
第1天
第2天
第3天
第4天
第5天
第6天
第7天
研究天数
G1-对照
G2-DCOY-10
G3-DCOY-5
G4DCOY-2.5
G5-DCOY-1

图8

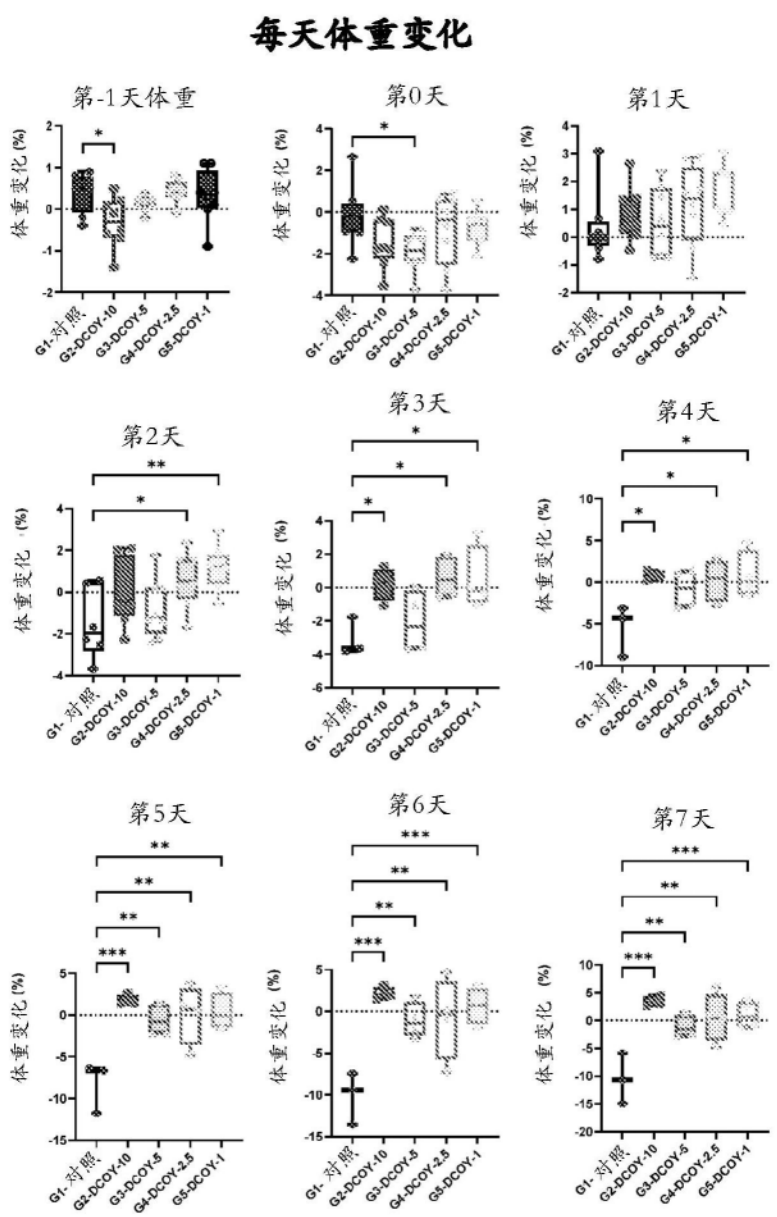

每天体重变化
第-1天体重
第0天
第1天
第2天
第3天
第4天
第5天
第6天
第7天
体重变化 (%)
G1-对照
G2-DCOY-10
G3-DCOY-5
G4-DCOY-2.5
G5-DCOY-1

图9

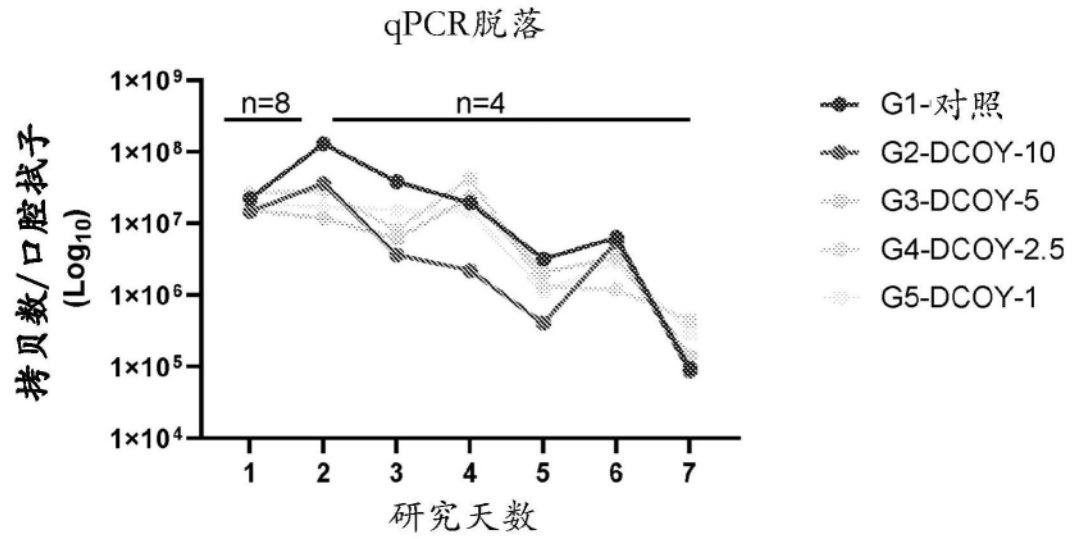

qPCR脱落
拷贝数/口腔拭子 (Log10)
1×10⁹
1×10⁸
1×10⁷
1×10⁶
1×10⁵
1×10⁴
n=8
n=4
1
2
3
4
5
6
7
研究天数
G1-对照
G2-DCOY-10
G3-DCOY-5
G4-DCOY-2.5
G5-DCOY-1

图10

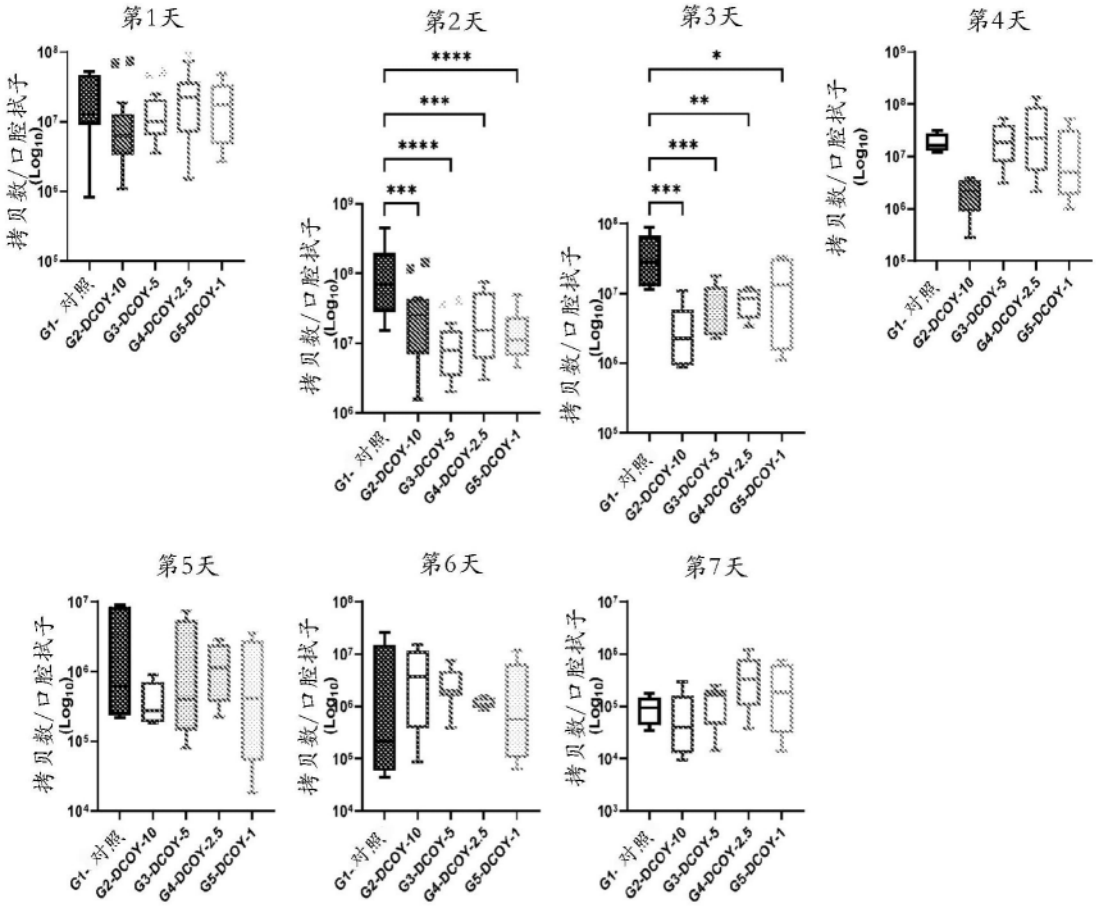

第1天
第2天
第3天
第4天
第5天
第6天
第7天
拷贝数/口腔拭子 (Log10)
G1-对照
G2-DCOY-10
G3-DCOY-5
G4-DCOY-2.5
G5-DCOY-1

图11

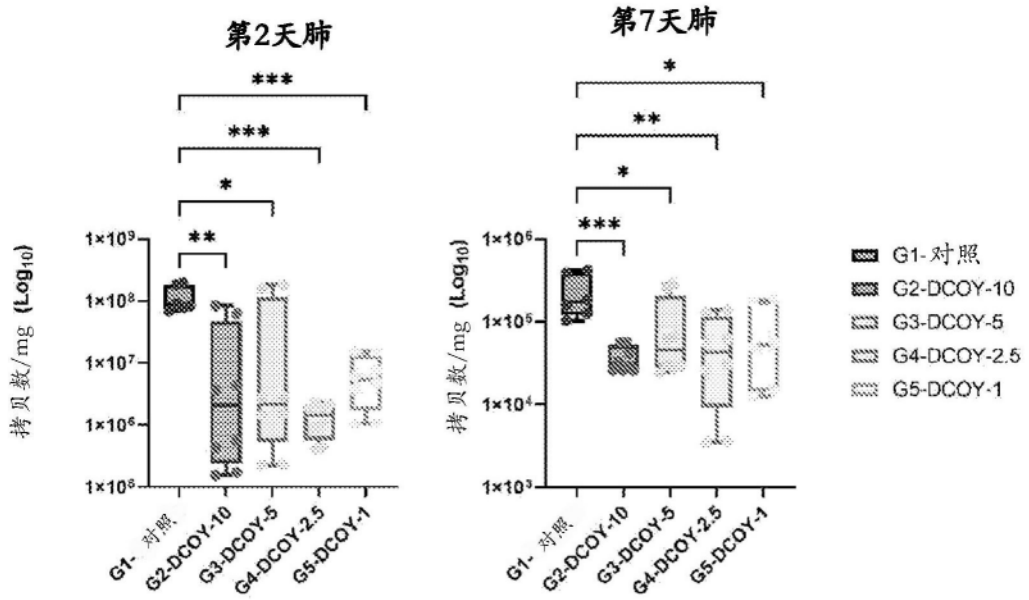

第2天肺
第7天肺
拷贝数/mg (Log10)
1×10⁹
1×10⁸
1×10⁷
1×10⁶
1×10⁵
1×10⁴
1×10³
***
**
*
G1-对照
G2-DCOY-10
G3-DCOY-5
G4-DCOY-2.5
G5-DCOY-1

图12

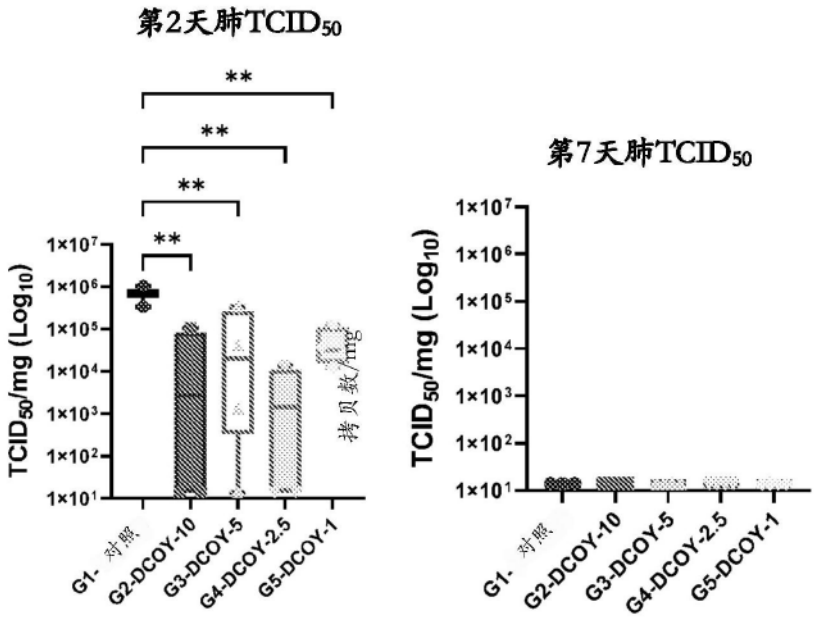

第2天肺TCID50
第7天肺TCID50
TCID50/mg (Log10)
拷贝数/mg
1×10⁷
1×10⁶
1×10⁵
1×10⁴
1×10³
1×10²
1×10¹
**
G1-对照
G2-DCOY-10
G3-DCOY-5
G4-DCOY-2.5
G5-DCOY-1

图13

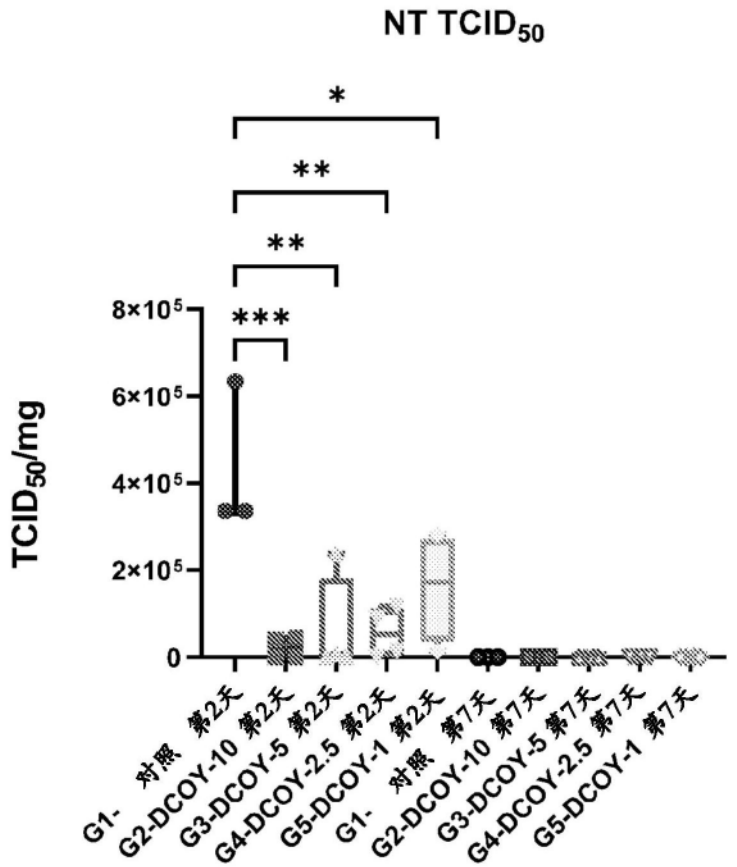

NT TCID50
*
**
**
***
8×10^5
6×10^5
4×10^5
2×10^5
0
TCID50/mg
G1- 对照 第2天
G2-DCOY-10 第2天
G3-DCOY-5 第2天
G4-DCOY-2.5 第2天
G5-DCOY-1 第2天
G1- 对照 第7天
G2-DCOY-10 第7天
G3-DCOY-5 第7天
G4-DCOY-2.5 第7天
G5-DCOY-1 第7天

图14

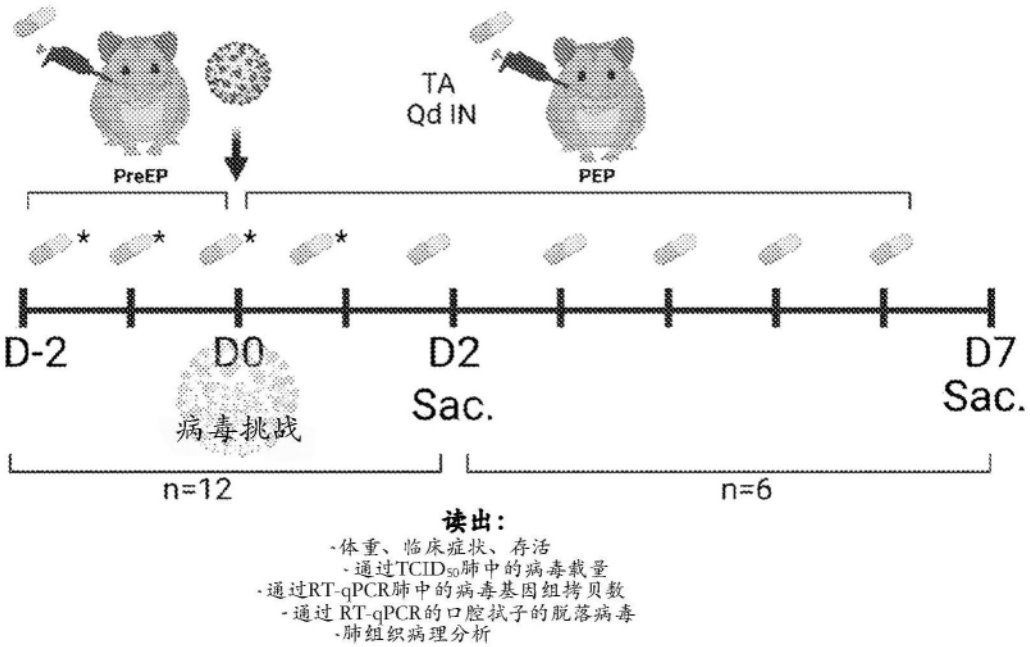

TA
Qd IN
PreEP
PEP
D-2
D0
D2
Sac.
D7
Sac.
病毒挑战
n=12
n=6
读出:
-体重、临床症状、存活
-通过TCID50肺中的病毒载量
-通过RT-qPCR肺中的病毒基因组拷贝数
-通过 RT-qPCR的口腔拭子的脱落病毒
-肺组织病理分析

图15

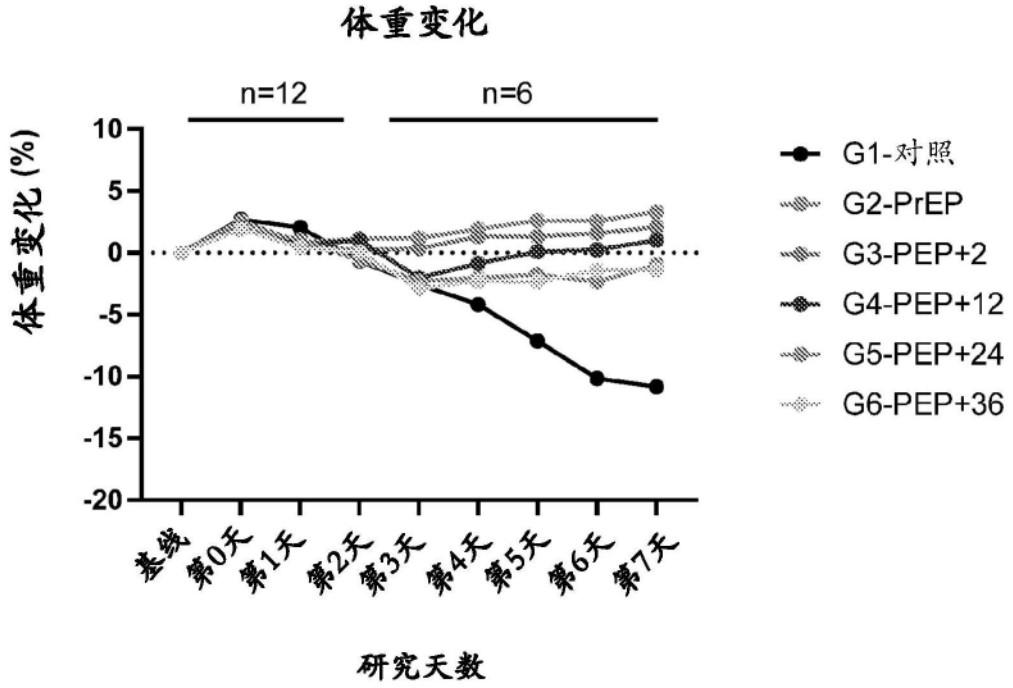

体重变化
n=12
n=6
体重变化(%)
10
5
0
-5
-10
-15
-20
基线
第0天
第1天
第2天
第3天
第4天
第5天
第6天
第7天
研究天数
G1-对照
G2-PrEP
G3-PEP+2
G4-PEP+12
G5-PEP+24
G6-PEP+36

图16

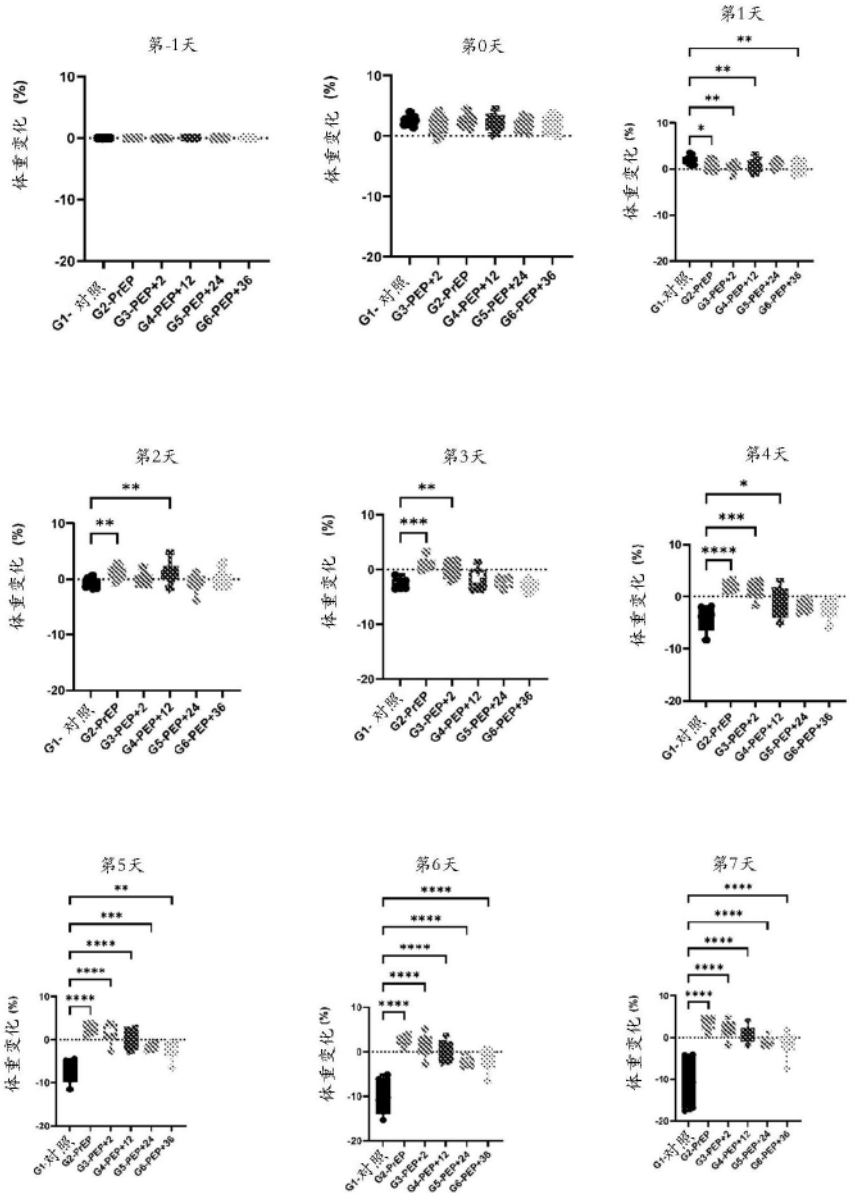

第-1天
第0天
第1天
第2天
第3天
第4天
第5天
第6天
第7天
体重变化 (%)
G1-对照
G2-PrEP
G3-PEP+2
G4-PEP+12
G5-PEP+24
G6-PEP+36

图17

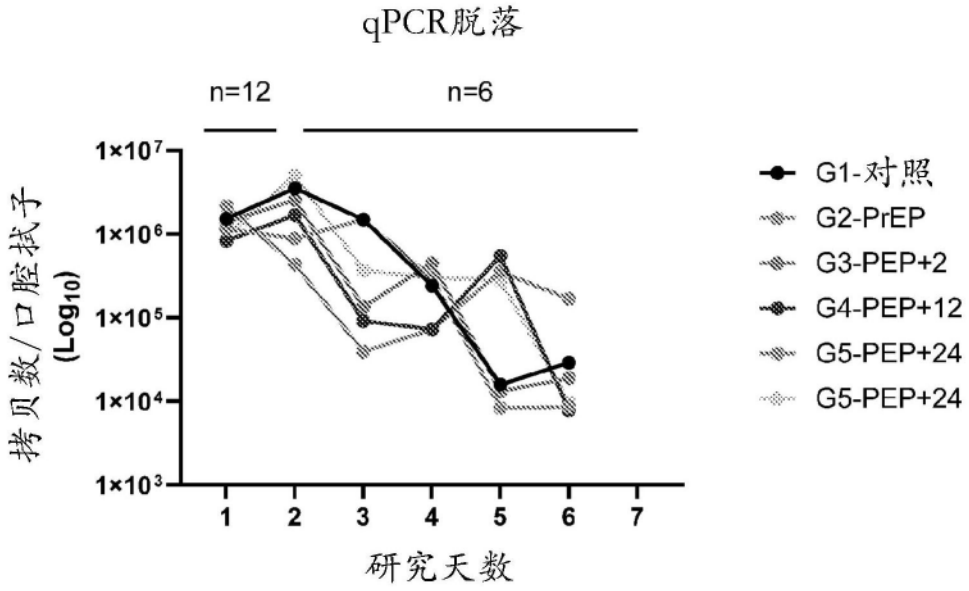

qPCR脱落
n=12
n=6
1×10⁷
1×10⁶
1×10⁵
1×10⁴
1×10³
拷贝数/口腔拭子 (Log10)
1
2
3
4
5
6
7
研究天数
G1-对照
G2-PrEP
G3-PEP+2
G4-PEP+12
G5-PEP+24
G5-PEP+24

图18

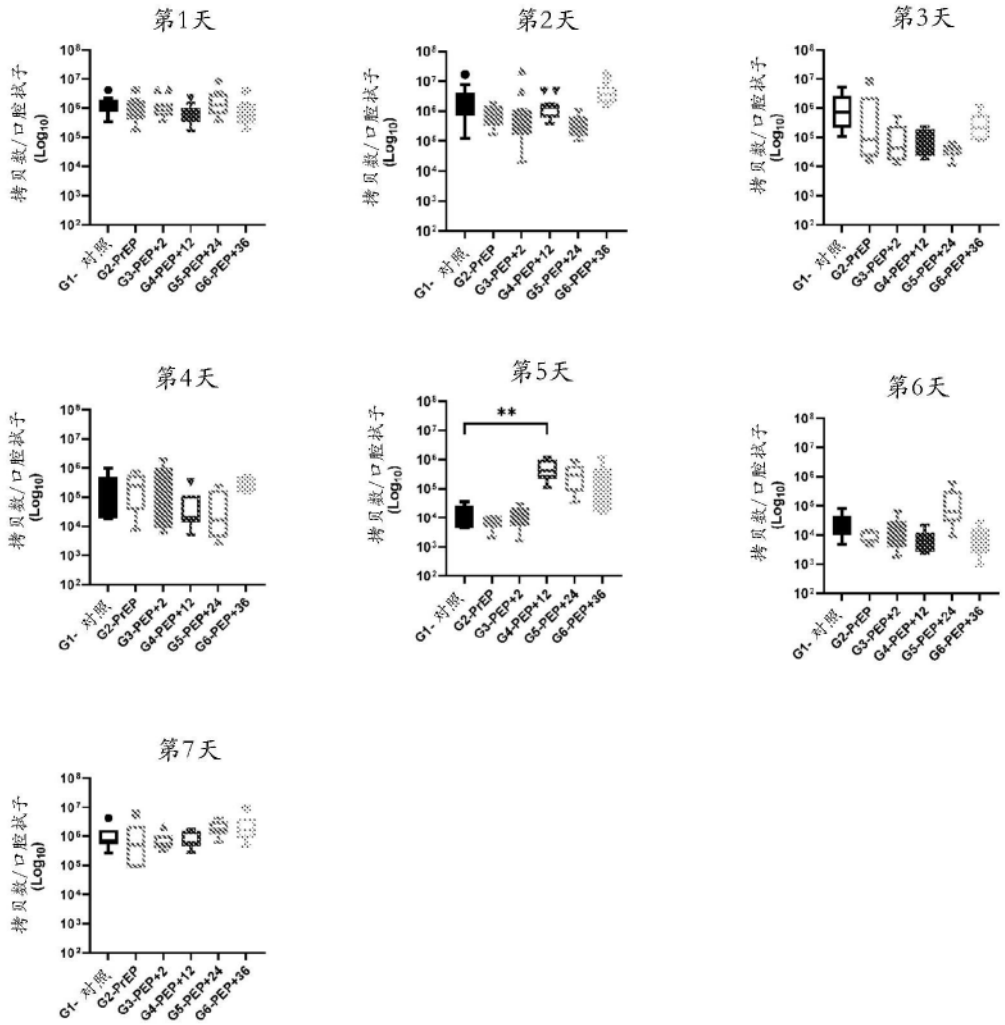

第1天
第2天
第3天
第4天
第5天
第6天
第7天
拷贝数/口腔拭子 (Log10)
**
G1- 对照
G2-PrEP
G3-PEP+2
G4-PEP+12
G5-PEP+24
G6-PEP+36

图19

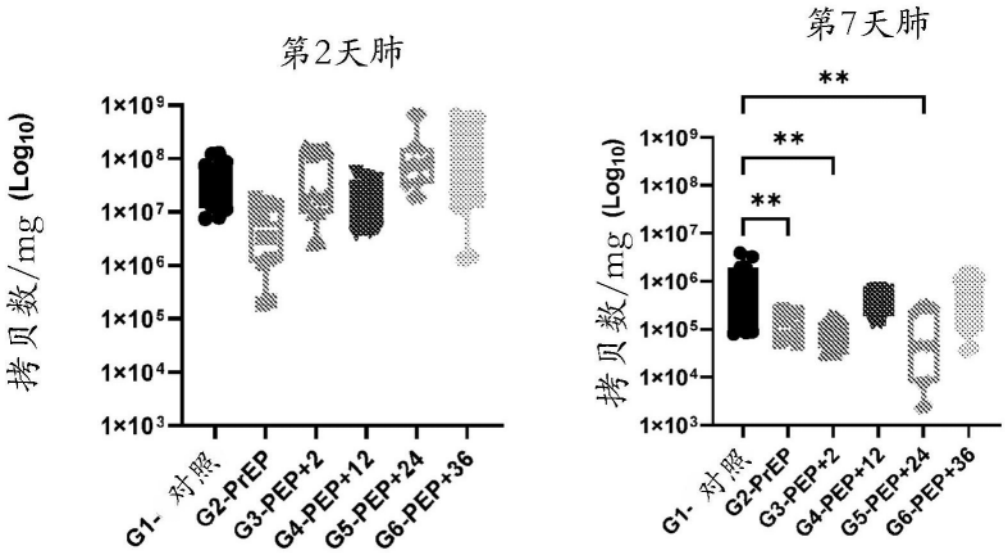

第2天肺
第7天肺
拷贝数/mg (Log10)
1×10⁹
1×10⁸
1×10⁷
1×10⁶
1×10⁵
1×10⁴
1×10³
**
G1- 对照
G2-PrEP
G3-PEP+2
G4-PEP+12
G5-PEP+24
G6-PEP+36

图20

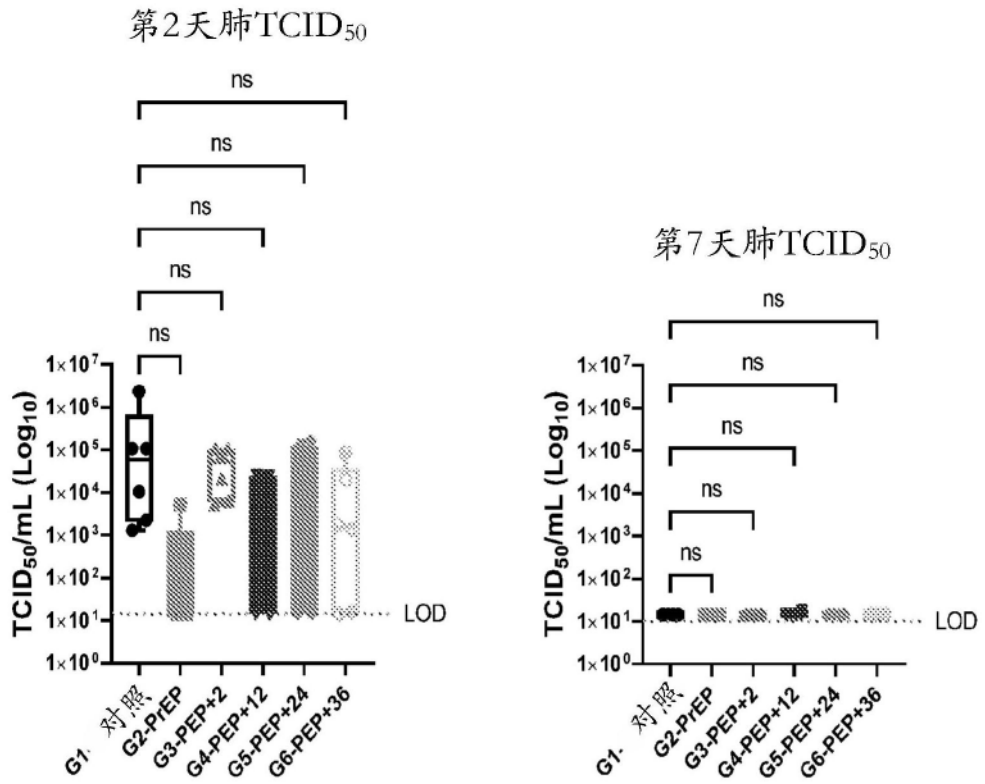

第2天肺TCID50
第7天肺TCID50
TCID50/mL (Log10)
LOD
ns
G1. 对照
G2-PrEP
G3-PEP+2
G4-PEP+12
G5-PEP+24
G6-PEP+36

图21

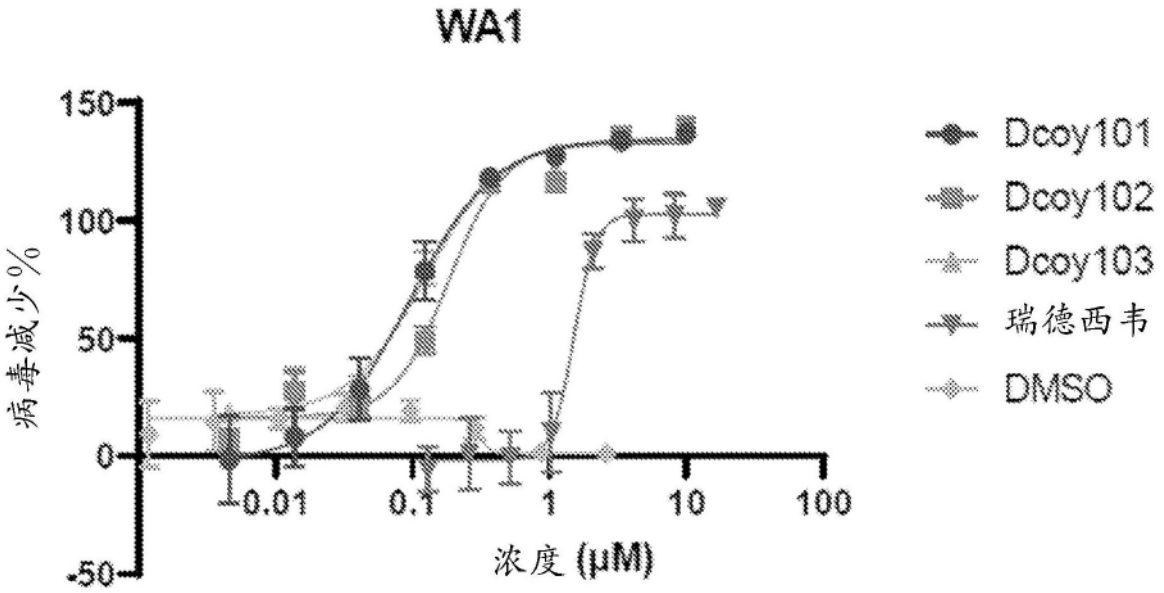

WA1
病毒减少%
浓度 (μM)
Dcoy101
Dcoy102
Dcoy103
瑞德西韦
DMSO

图22

δ

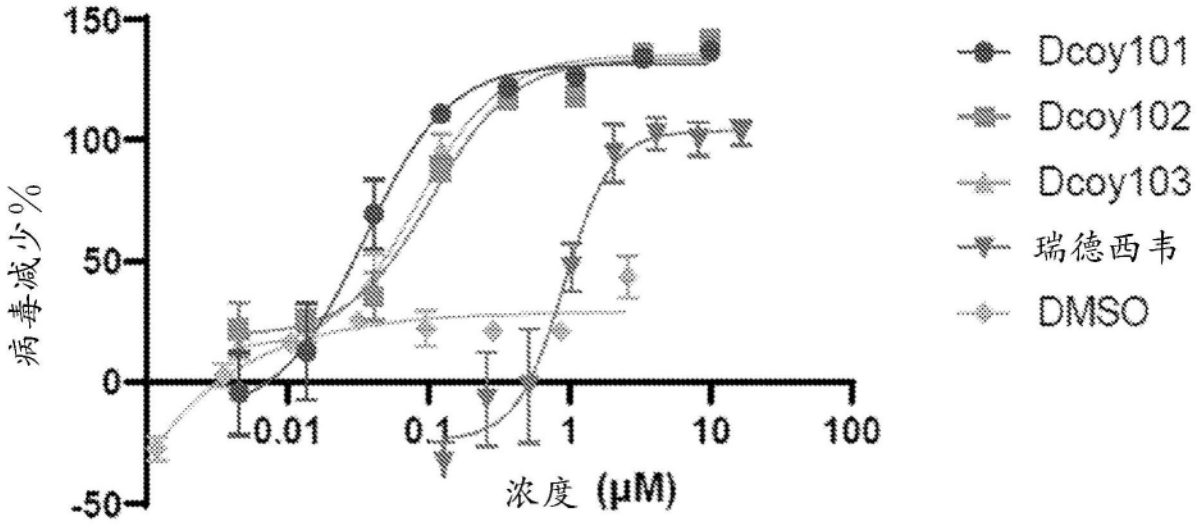

150
100
50
0
-50
病毒减少%
0.01
0.1
1
10
100
浓度 (μM)
Dcoy101
Dcoy102
Dcoy103
瑞德西韦
DMSO

图23

o

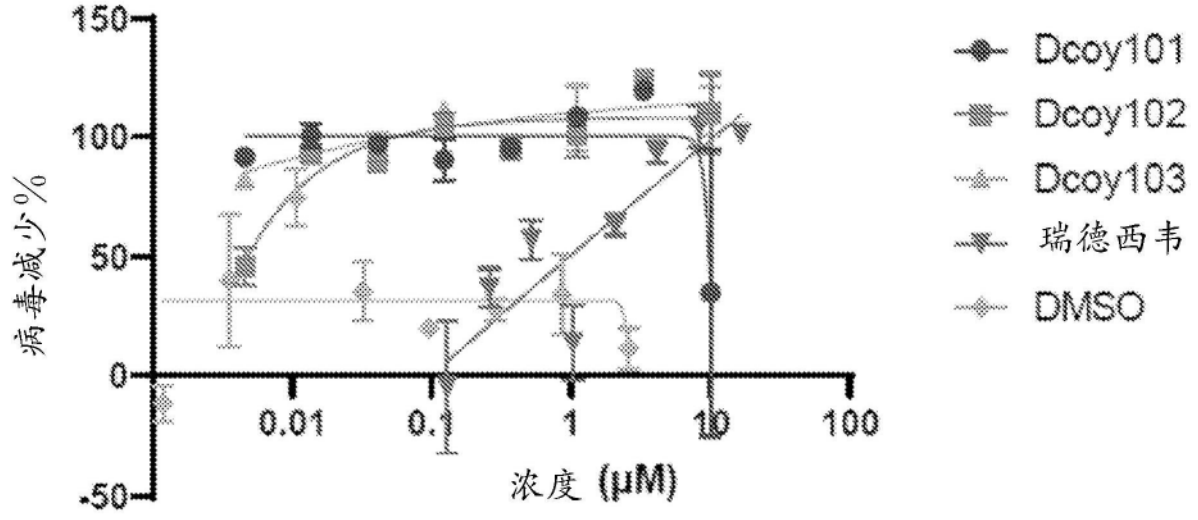

150
100
50
0
-50
病毒减少%
0.01
0.1
1
10
100
浓度 (μM)
Dcoy101
Dcoy102
Dcoy103
瑞德西韦
DMSO

图24

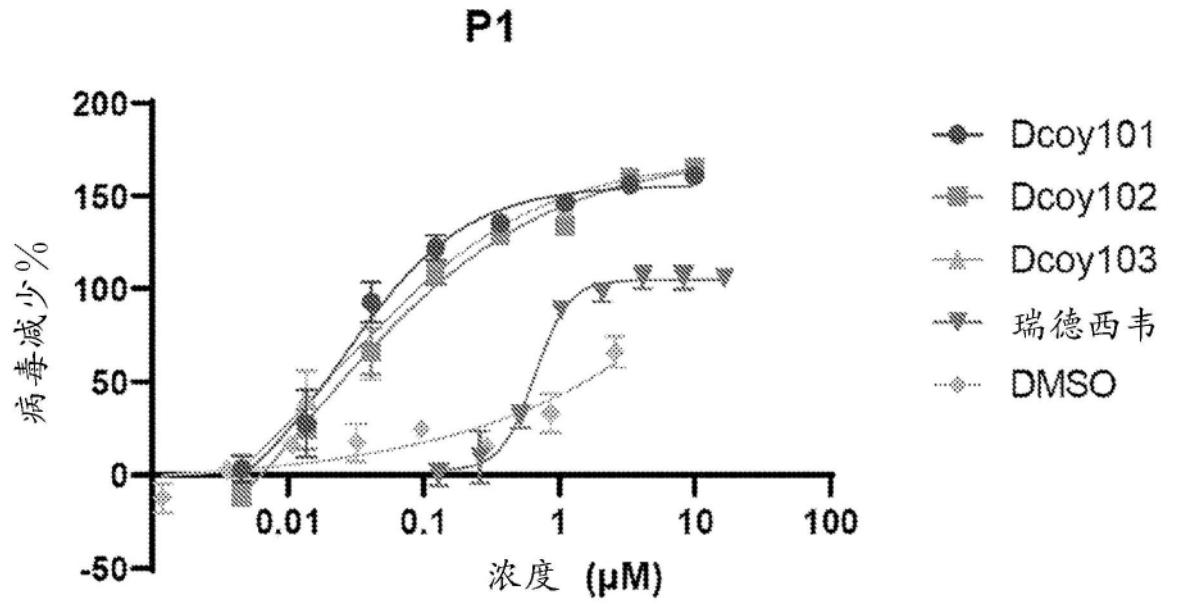

P1
病毒减少%
200
150
100
50
0
-50
0.01
0.1
1
10
100
浓度 (μM)
Dcoy101
Dcoy102
Dcoy103
瑞德西韦
DMSO

图25

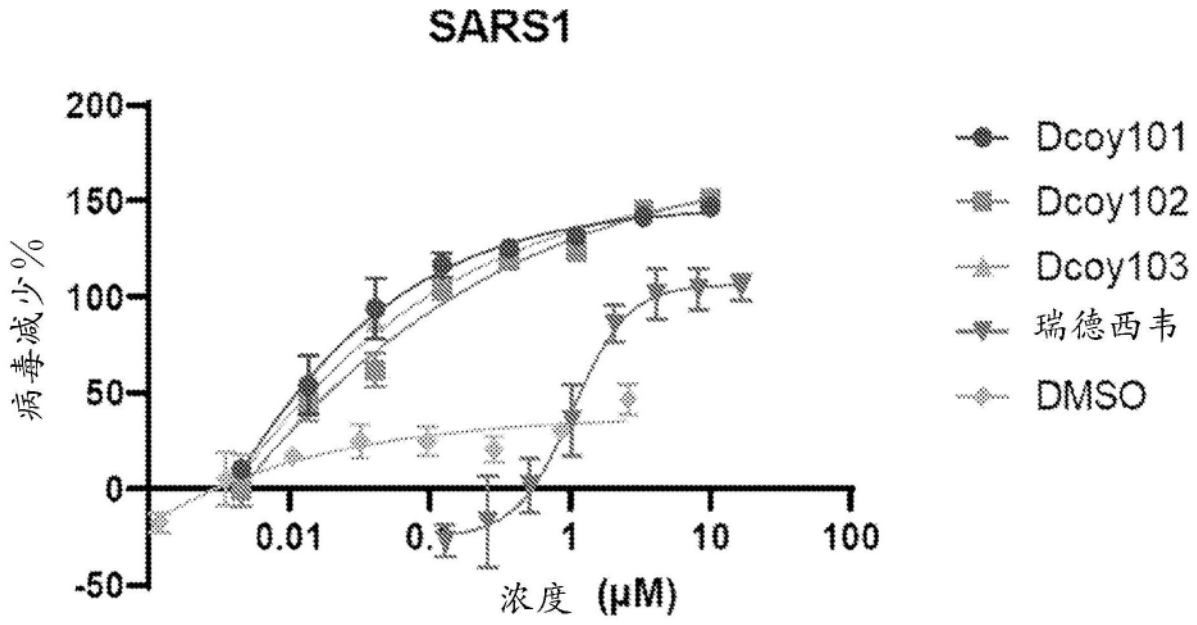

SARS1
病毒减少%
200
150
100
50
0
-50
0.01
0.1
1
10
100
浓度 (μM)
Dcoy101
Dcoy102
Dcoy103
瑞德西韦
DMSO

图26

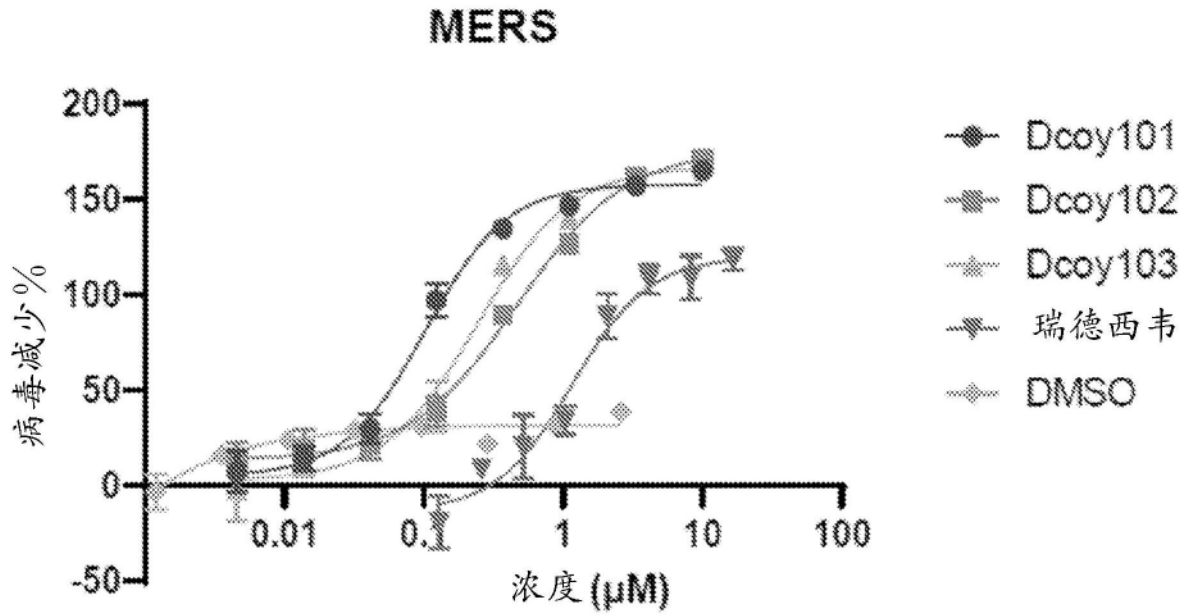

MERS
病毒减少%
200
150
100
50
0
-50
0.01
0.1
1
10
100
浓度(μM)
Dcoy101
Dcoy102
Dcoy103
瑞德西韦
DMSO

图27

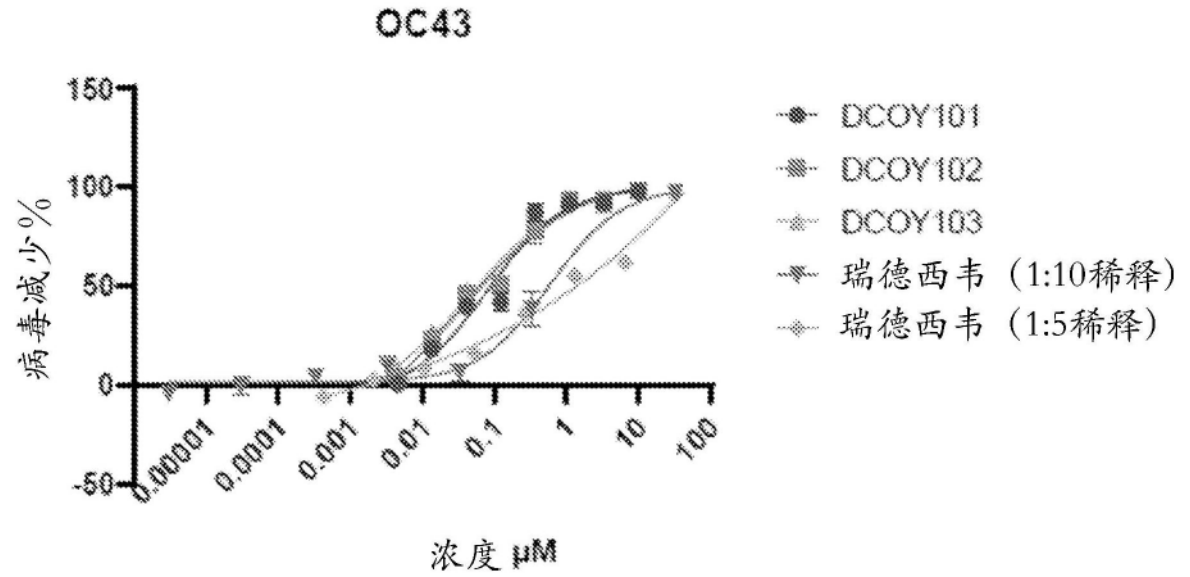

OC43
病毒减少%
150
100
50
0
-50
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
浓度 μM
DCOY101
DCOY102
DCOY103
瑞德西韦 (1:10稀释)
瑞德西韦 (1:5稀释)

图28